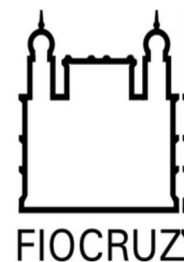




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MICROBIÓPSIA DE PELE NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE
TRANSMISSÃO DE CÃES INFECTADOS POR *LEISHMANIA*
INFANTUM AO INSETO VETOR E NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

TIAGO FEITOSA MOTA

Salvador – Bahia

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**MICROBIÓPSIA DE PELE NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE
TRANSMISSÃO DE CÃES INFECTADOS POR *LEISHMANIA*
INFANTUM AO INSETO VETOR E NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

TIAGO FEITOSA MOTA

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Co-orientador: Prof. Dr. Alon Warburg

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
Mestre.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M917p Mota, Tiago Feitosa
Papel da microbiópsia de pele na avaliação da capacidade de transmissão de
cães infectados por *Leishmania infantum* ao inseto vetor e no diagnóstico da
leishmaniose visceral canina. / Tiago Feitosa Mota. - 2018.
83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga, Laboratório
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.
Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia,
Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Pele. 2. Xenodiagnóstico. 3. Transmissibilidade. 4. Biópsia. 5.
Diagnóstico. 6. Leishmaniose visceral. I. Título.

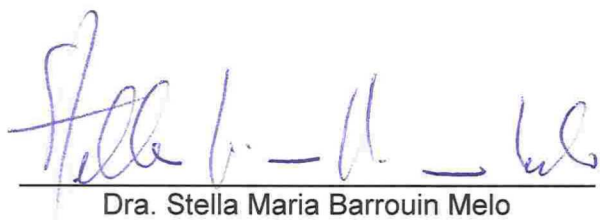
CDU 616.5:616.993.161

“PAPEL DA MICROBIÓPSIA DE PELE NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSMISSÃO DE CÃES INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM* AO INSETO VETOR E NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”

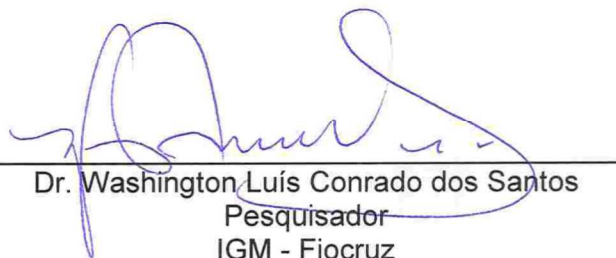
TIAGO FEITOSA MOTA
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 04 de maio de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Stella Maria Barrouin Melo
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
IGM - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que participaram direta e indiretamente em todo a meu projeto de mestrado e em todos os momentos bons e ruins. Serei sempre grato a todos.

Agradeço a minha orientadora Dra. Deborah por toda paciência, pela ética profissional inspiradora, pelo exemplo de pesquisadora que é, pelo tempo dedicado e compartilhado para a boa execução dos experimentos.

Ao meu co-orientador Alon Warburg por ter sugerido o projeto em parceria com seu laboratório na “Hebrew University of Jerusalem” e contribuído de forma indispensável com o desenho e soluções dos experimentos.

Agradeço a meu pais e irmãos pelos momentos divertidos, felizes, difíceis, tristes, complicados e agradáveis que me tornaram quem sou hoje.

Aos amigos e colegas que conheci durante todo o período que passei no Instituto Gonçalo Moniz desde a minha iniciação científica e que contribuíram com boas memórias e momentos inesquecíveis.

A estudante de iniciação científica Maria Helena, estudante de mestrado Maiara Arruda e em especial a Dra. Kelsilândia Martins, as companheiras do insetário, que me ajudaram na árdua batalha de montar e estabelecer uma colônia de flebotomíneos desde o início. Sem essa ajuda o projeto não poderia ser realizado.

A Dra. Manuela Solcà pelos dados e diagnósticos dos cães selecionados para o meu projeto de mestrado.

A Livia Coelho pela grande contribuição nos xenodiagnósticos segurando os flebotomíneos por 30min no cão e ajudando com as disseções e a Ms. Bruna Leite pela ajuda imprescindível na extração de DNA de diversas amostras.

Ao melhor motorista do IGM, Amaro Nunes Da Silva, “seu” Amaro, que pacientemente nos levou a todas as casas para a realização do projeto inclusive saindo às 6h da manhã para coletar os primeiros flebotomíneos da colônia.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto apoio que tornaram possível a execução do projeto de pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca do IGM por toda a ajuda prestada nas pesquisas efetuadas na referida biblioteca.

Aos membros da banca examinadora da dissertação de mestrado, pelas críticas construtivas que ajudaram a melhorar o trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto.

À Fiocruz e ao IGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos.

MOTA, Tiago Feitosa. Papel da microbiópsia de pele na avaliação da capacidade de transmissão de cães infectados por *Leishmania infantum* ao inseto vetor e no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 78 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral é uma zoonose negligenciada de importância global. Nas Américas é causada por protozoários da espécie *Leishmania infantum*, e transmitida por meio da picada de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O cão é o principal hospedeiro no meio urbano e quando infectado possui alta carga parasitária na pele, favorecendo seu papel na transmissão do parasito ao vetor. Assim, torna-se importante a realização de estudos para avaliar sua capacidade de transmissão ao vetor. A única técnica utilizada na avaliação da transmissibilidade é o xenodiagnóstico, que é muito laborioso, tem custo elevado e baixa sensibilidade. A microbiópsia de pele (MB) pode ser uma alternativa mais rápida e simples para sua substituição, dado que coleta tecido cutâneo e sanguíneo como ocorre na picada de flebotomíneos. A MB também pode ser uma alternativa promissora para ser utilizada no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) por ser menos invasiva que a biópsia convencional de pele (BC), podendo ser realizada em qualquer sítio anatômico onde a BC não é indicada devido ao risco de lesões e sangramentos. **OBJETIVO:** Avaliar a utilização da MB como alternativa para o xenodiagnóstico na avaliação da transmissibilidade e como alternativa para o diagnóstico da LVC frente a BC. **MÉTODO:** A MB foi realizada em diversos locais como patas, região escapular, orelhas, focinho e áreas de alopecia de 26 animais naturalmente infectados e seus resultados foram comparados aos obtidos na qPCR de aspirado esplênico e BC. Foram realizados xenodiagnósticos, BCs na região escapular esquerda e MB no focinho, abdômen e face interna da orelha esquerda de outros 35 cães infectados por *L. infantum*. Todos os animais foram classificados em sintomáticos e assintomáticos por meio de um sistema de escore clínico. Os flebotomíneos utilizados no xenodiagnóstico foram mantidos no insetário e dissecados em dois momentos, no 2º ou 3º dia e entre o 8º e 10º dia, com observação direta sob microscopia óptica (40x) dos intestinos médios na busca por formas promastigotas de *L. infantum*. As amostras de pele obtidas nas MBs e BCs tiveram o seu DNA extraído e foi realizada qPCR buscando o kDNA do parasita. As positivities dos testes foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher e o índice kappa. A carga parasitária obtida nas MBs positivas dos dois grupos de animais foi correlacionada pelo teste de Kruskal-Wallis. **RESULTADOS:** Não houve diferença estatística entre a sensibilidade da qPCR da MB, do aspirado esplênico e BC. Da mesma forma a positividade no xenodiagnóstico não foi diferente dentre as classificações clínicas. A MB detectou mais animais positivos em comparação ao xenodiagnóstico de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a carga parasitária da MB e BC. **CONCLUSÃO:** A MB pode vir a ser utilizada como alternativa para o diagnóstico da LVC pois é tão sensível quanto a BC e pode auxiliar na identificação de locais da pele do cão onde o xenodiagnóstico terá maior sensibilidade. Ela também pode substituir o xenodiagnóstico na avaliação da ingestão do parasito que antecede a defecação do flebotomíneo após o repasto sanguíneo.

Palavras-chave: Xenodiagnóstico, Transmissibilidade, Diagnóstico minimamente invasivo, Microbiópsia de pele, qPCR de amostra de pele.

MOTA, Tiago Feitosa. Role of skin microbiopsy in the evaluation of the infectiousness of dogs infected with *L. infantum* and in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. 78 f. il. Dissertation (Master in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis is a neglected zoonosis of global importance. In the Americas it is caused by protozoa of the species *Leishmania infantum*, and transmitted by the bite of sandflies of the species *Lutzomyia longipalpis*. The dog is the main host in the urban area and when infected has high parasite load in the skin, favoring its role in the parasite transmission. Thus, it is important to carry out studies to evaluate its transmission potential. The only technique used for infectiousness evaluations is the xenodiagnosis, which is very laborious, has a high cost and low sensitivity. Skin microbiology (MB) may be a quicker and simpler alternative for its replacement, since it collects cutaneous and blood tissue as occurs in the sandfly bite. MB can also be a promising alternative to be used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) because it is less invasive than conventional skin biopsy (SB), and can be performed in any anatomic site where SB is not indicated due to the risk of lesions and bleeding. **OBJECTIVE:** To evaluate the use of MB as an alternative for xenodiagnosis in the infectiousness evaluation and as an alternative for the diagnosis of CVL in comparison with SB. **METHODS:** MB was performed in several places such as paws, scapular region, ears, muzzle and areas of alopecia of 26 naturally infected animals and their results were compared to those obtained in qPCR of splenic aspirate and SB. Xenodiagnosis, BCs in the left scapular region and MB were performed on the muzzle, abdomen and inner face of the left ear of another 35 dogs infected with *L. infantum*. All animals were classified as symptomatic and asymptomatic by means of a clinical score system. The sandflies used in the xenodiagnosis were kept in the insectary and dissected in two moments, on the 2nd or 3rd day and between the 8th and 10th day, with direct observation under light microscopy (40x) of the midguts in the search for promastigote forms of *L. infantum*. The skin samples obtained in the MBs and SBs had their DNA extracted and qPCR was performed looking for the kDNA of the parasite. Positive tests were compared using Fisher exact test and the kappa index. The parasite load obtained in the positive MBs of the two groups of animals was correlated by Kruskal-Wallis test. **RESULTS:** There was no statistical difference between the qPCR sensitivity of MB, splenic aspirate and SB. Likewise, positivity in xenodiagnosis was not different among clinical classifications. MB detected more positive animals compared to xenodiagnosis in a statistically significant way ($p < 0.05$). There was no significant difference between the MB and SB parasite load. **CONCLUSION:** MB can be used as an alternative for the diagnosis of CVL, since it is as sensitive as SB and can help in the identification of dog's skin sites where xenodiagnosis will be more sensitive. It may also replace xenodiagnosis in the evaluation of parasite ingestion that precedes defecation of sand flies after blood meal.

Keywords: Xenodiagnosis, Transmissibility, Minimally invasive diagnosis, Skin microbiopsy, Skin qPCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem comparativa do local da pele após a realização da biópsia (à esquerda) e do tamanho do material obtido (à direita) na biópsia convencional com punch de 3mm (BC) e microbiópsia de pele (MB). Modificado: Lin et al., 2013.....30
- Figura 2: Comparação do tamanho do punch de 3mm utilizado na biópsia convencional de pele com a lâmina do dispositivo de microbiópsia (2A), ilustração do dispositivo de microbiópsia de pele (2B), comparação do tamanho da probóscide de um flebotomíneo com a ponta da MB que é inserida na pele (2C) e ilustração dos modelos MB1 que só coleta amostra de pele e MB2 com papel filtro interno para a absorção de sangue, que foi o utilizado neste estudo (2D). Fonte Kirstein et al., 2017.....31
- Figura 3: Realização de microbiópsia de pele na face interna da orelha esquerda de cão naturalmente infectado por *L. infantum* e de biópsia convencional com punch de 3mm no mesmo cão, sendo realizada na região escapular esquerda.....38
- Figura 4: Manuseio do dispositivo de MB após a coleta da amostra de pele começando Pele abertura do dispositivo, retirada do plástico no qual as lâminas de metal com a amostra ficam inseridas, retirada das lâminas contendo a amostra utilizando pinças previamente esterilizadas com álcool 70% e armazenamento em microtubos de 1,5mL contendo 200µL de reagente de extração.....39
- Figura 5: Sítios da pele usados para a realização do xenodiagnóstico e microbiópsia de pele focinho, face interna da orelha esquerda e abdômen; inflamação local após a realização do xenodiagnóstico; o recipiente utilizado no xenodiagnóstico no qual foram colocadas entre 60 e 80 fêmeas de flebotomíneo para a realização o exame.....40
- Figura 6: Separação das fêmeas de flebotomíneo alimentadas após o repasto sanguíneo no xenodiagnóstico com a representação dos insetos dormindo sobre o gesso do pote gelado durante a separação e três fêmeas observadas através do estereomicroscópio, sendo a da extrema esquerda considerada pouco alimentada, a do centro bem alimentada e a da extrema direita, não alimentada.....41

- Figura 7: Recipientes utilizados para manter os flebotomíneos após a separação das fêmeas alimentadas até a realização das disseções, sendo representado o interior do pote com um pequeno pote de gesso e papéis afixados nas paredes e algumas fêmeas de flebotomíneo alimentadas pousadas sobre papel toalha após a separação.....42
- Figura 8: Observação dos intestinos dissecados por meio de microscopia óptica, sendo um intestino sem a presença de parasitos (40x) representado, uma massa de parasitos (círculo vermelho) saindo de um intestino médio infectado (10x), formas promastigotas de leishmania (setas vermelhas) saindo da válvula estomodeal (40x) após 8-10 dias da realização do xenodiagnóstico, e também formas promastigotas (setas vermelhas) próximo ao intestino dissecado dois dias após o repasto sanguíneo.....43
- Figura 9: Monitoramento da colônia de *L. longipalpis* de Camaçari/BA no seu primeiro ano (entre maio de 2016 e abril de 2017), sendo contabilizado o número de fêmeas alimentadas por semana e o número total de potes da colônia, semanalmente, entre setembro de 2016 e maio de 2017.....48
- Figura 10: Histograma das sensibilidades das qPCRs de aspirado esplênico (AE), biópsia convencional de pele com punch de 3mm (BC) e microbiópsias de pele (MB), avaliando 26 cães quanto à infecção natural por *L. infantum*. As MBs foram realizadas no focinho e nas orelhas esquerda (OE) e direita (OD), sendo os outros locais, região escapular esquerda, pata e área com alopecia, retirados da análise devido à baixa amostragem nestes locais. A análise utilizando o teste exato de Fisher não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.....52
- Figura 11: Comparação entre as medianas das cargas parasitárias encontradas nas BCs e MBs realizadas no focinho, orelha esquerda (OE), orelha direita (OD) e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Diferenças metodológicas de xenodiagnósticos realizados em cães infectados por <i>L. infantum</i> encontradas na literatura.....	23
Tabela 2:	Sistema de escore clínico utilizado para agrupar os cães em dois grupos, assintomáticos (escore ≤ 3) e sintomáticos (escore > 3).....	37
Tabela 3:	Acompanhamento das primeiras gerações da colônia de <i>L. longipalpis</i> de Camaçari/BA.....	47
Tabela 4:	Diagnóstico prévio e positividade encontrada nos 40 cães selecionados para o estudo piloto.....	49
Tabela 5:	Microbiópsias de pele positivas, realizadas em diversos locais da pele, e suas cargas parasitárias detectada por qPCR nos 14 cães que tiveram pelo menos uma delas com resultado positivo.....	51
Tabela 6:	Descrição geral dos 35 cães selecionados para o estudo entre a MB, xenodiagnóstico e BC.....	53
Tabela 7:	Taxas de alimentação dos xenodiagnósticos realizados no focinho, orelha esquerda e abdômen de 20 cães sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e suas taxas de infecção no segundo (entre o 2° e 3° dia) e terceiro (entre o 8° e 10° dia) ponto de avaliação após o repasto sanguíneo.....	55
Tabela 8:	Percentual de cães que transmitiram <i>L. infantum</i> ao vetor <i>L. longipalpis</i> por meio do xenodiagnóstico e MBs com kDNA do parasito detectado por qPCR, realizados no mesmo local da pele de 35 cães naturalmente infectados com diferentes classificações clínica.....	57
Tabela 9:	Taxas de infecção global de cada cão e resultado do xenodiagnóstico e carga parasitária das MBs realizadas no focinho, orelha esquerda e abdômen de 20 cães sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	58
Tabela 10:	Positividades dos xenodiagnósticos e MBs considerando a presença de lesões cutânea características da LVC e suas respectivas Odds Ratios.....	59
Tabela 11:	Comparação entre as sensibilidades das BCs e MBs em três locais diferentes da pele de 31 cães avaliados quanto à capacidade de transmitir <i>L. infantum</i> ao vetor <i>L. longipalpis</i> utilizando a qPCR. A sensibilidade foi estratificada de acordo com a apresentação clínica da doença.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV Leishmaniose visceral

LVC Leishmaniose visceral canina

MB Microbiópsia de pele

BC Biópsia convencional de pele (punch 3mm)

CEUA Comitê de Ética no uso de animais

IGM Instituto Gonçalo Moniz

Th1 Célula T *helper* 1

Th2 Célula T *helper* 2

PCR *Polymerase chain reaction* – (Reação em cadeia da polimerase)

qPCR *Real time* PCR – (PCR quantitativa)

CT *Threshold Cycle*

DNA Ácido desoxirribonucleico

kDNA DNA Cinetoplasto

IgG Imunoglobulina G

IgG2 Imunoglobulina G 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	14
1.2	TRANSMISSÃO.....	16
1.3	LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.....	18
1.4	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	19
1.5	XENODIAGNÓSTICO.....	21
1.6	INFECTIVIDADE DO CÃO.....	26
1.7	DIAGNÓSTICO.....	27
1.8	MICROBIÓPSIA DE PELE.....	29
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i>	34
4.2	SELEÇÃO DOS CÃES.....	35
4.3	TESTE PILOTO DA MICROBIÓPSIA DE PELE.....	37
4.4	XENODIAGNÓSTICO X MICROBIÓPSIA DE PELE.....	39
4.5	BIÓPSIA CONVENCIONAL DE PELE.....	44
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	44
4.6.1	Microbiópsia de pele	44
4.6.2	Biópsias convencionais de pele	44
4.7	PCR QUANTITATIVA.....	44
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS	47
5.1	ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE <i>L. LONGIPALPIS</i> DE CAMAÇARI.....	47
5.2	AValiação PILOTO DA MICROBIÓPSIA DE PELE.....	48
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS NO XENODIAGNÓSTICO X MICROBIÓPSIAS DE PELE.....	52
5.4	PRESENÇA LESÃO CUTÂNEA CARACTERÍSTICA DA LVC.....	59
5.5	MICROBIÓPSIA DE PELE COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO.....	59
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada de importância global, causada nas Américas por protozoários da espécie *Leishmania infantum*, que parasitam células do sistema fagocítico mononuclear no hospedeiro vertebrado na forma de amastigotas (BRASIL, 2014a). Estes parasitos são transmitidos, principalmente, por meio da picada de flebotomíneos fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* que albergam em seu intestino médio formas promastigotas no estágio metacíclico da *L. infantum* (KAMHAWI, 2006). No ano de 2015, mais de 25.000 novos casos de LV foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017). Destes casos, Brasil, Índia, Sudão e Sudão do Sul compuseram um grupo de países que contribuíram com mais de 2.000 cada um neste mesmo ano, sendo reportados somente no Brasil mais de 3.000 casos (DOS REIS et al., 2017; OMS, 2017). Apesar desta incidência alarmante, a situação real pode ser ainda pior, dado que há subnotificação de casos, principalmente em países onde a notificação não é obrigatória e mesmo quando compulsória, os casos nem sempre são diagnosticados.

Mais de 90% dos casos ocorrem em 7 países, Etiópia, Quênia e Somália juntamente com os supracitados, sendo 40% dos casos notificados no leste africano, 39% no subcontinente indiano e 14% dos casos mundiais somente no Brasil (OMS, 2017). Historicamente, o subcontinente indiano representava a maioria das notificações anuais à OMS (ALVAR et al., 2012), no entanto, houve um maior número de casos notificados na região do leste africano no ano de 2015, devido aos conflitos políticos e sociais que esta região enfrenta (OMS, 2017). Milhares de pessoas de áreas endêmicas, como o Sudão do Sul, se refugiaram em regiões não endêmicas tanto do próprio país quanto em outros países da região, criando novos focos de transmissão e surtos de LV (AL-SALEM; HERRICKS; HOTEZ, 2016). Arelada a questões políticas, a baixa condição econômica das populações desta região e a falta de atenção básica à saúde por meio dos Estados também estão associados ao rápido crescimento que a doença teve no leste africano nos últimos anos (OMS, 2017). Na Somália, por exemplo, não há um programa nacional de controle da LV e a notificação não é obrigatória, o que contribui para o crescimento e expansão da doença em todo o país e em suas fronteiras com outros países como o Quênia e a Etiópia (SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2017).

Apesar do destaque global da região do sudoeste asiático na epidemiologia da doença, o número de casos na região reduziu drasticamente, devido à iniciativa regional entre a Índia, Bangladesh e Nepal para eliminar a LV (SINGH et al., 2016). Esta iniciativa visou reduzir o número de casos a menos de um caso por 10.000 habitantes até o ano de 2015 por meio do diagnóstico precoce e tratamento com anfotericina B ou miltefosina e do controle da população de flebotomíneos (OMS, 2015). Em Bangladesh, esta meta foi alcançada em quase todos os subdistritos, alvos do controle da doença, com redução de 140 para 6 subdistritos endêmicos entre os anos de 2005 e 2014 (CHOWDHURY et al., 2014). Esta redução bem-sucedida se estendeu a todos os subdistritos endêmicos do país no ano de 2017 (FITZPATRICK et al., 2017). No Nepal, houve uma diminuição de mesma magnitude da alcançada em Bangladesh, reduzindo significativamente o número de casos e mortes relacionadas a LV (SINGH et al., 2016). Da mesma forma, na Índia a meta de redução da iniciativa entre os três países foi alcançada em mais de 70% dos blocos endêmicos acompanhando a diminuição na mortalidade (OMS, 2015). No entanto, a Índia continua participando do pequeno grupo de países que contribuem com mais de 90% do número de casos anuais de LV reportados à OMS.

No Brasil, preconiza-se o controle da doença por meio do diagnóstico e tratamento de pacientes, controle vetorial por meio da aplicação de inseticidas ao redor dos casos confirmados e vigilância entomológica e eliminação de cães soropositivos (BRASIL, 2014a). Esta estratégia de controle não conseguiu impedir o crescimento da doença que ocorria majoritariamente na zona rural (CESSE et al., 2001). A rápida troca dos cães eliminados por cães susceptíveis, a demora entre a identificação dos animais soropositivos e sua retirada, bem como a inexistência de uma técnica diagnóstica capaz de identificar os cães transmissores, são alguns dos motivos levantados na literatura para explicar a ineficiência da estratégia de controle preconizada no Brasil (WERNECK, 2014). Até a década de 90 a região Nordeste apresentava o maior número de casos, representando cerca de 90% dos casos notificados (HARHAY et al., 2011). No entanto, devido ao processo de urbanização da doença causado por adaptação do vetor a ambientes urbanos, degradação ambiental e migração de populações humanas e caninas para centros urbanos, atualmente, todas as regiões do Brasil são consideradas endêmicas (PRADO et al., 2011). A doença está presente em 21 dos 26 Estados, ocorrendo, recentemente, casos autóctones humanos e caninos na região Sul do país, onde não ocorriam casos até o ano de 2008 no Rio Grande do Sul e 2013 em Santa Catarina e Paraná (STEINDEL et al., 2013; TRENCH et al., 2016; DOS REIS et al., 2017).

Na última década, diversos centros urbanos como Rio de Janeiro/RJ, Belo Horizonte/MG, Corumbá/MS, Teresina/PI e Camaçari/BA, reportaram surtos da LV em todo o país (BRASIL, 2014b). Na Bahia, o município de Camaçari, situado na região metropolitana de Salvador, é considerado como área de transmissão moderada, de acordo com os critérios utilizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). Casos humanos e caninos foram registrados desde a década de 90 neste mesmo município (CUNHA et al., 1995). Na literatura, a soroprevalência canina foi avaliada por diversos estudos que mostraram com diferentes tamanhos amostrais que entre 18,4% e 21,8% da população canina de Camaçari reagiram positivamente para testes sorológicos (BARBOZA et al., 2006; JULIÃO et al., 2007; GONÇALVES, 2014).

1.2 TRANSMISSÃO

A transmissão da LV ocorre, principalmente, por meio da picada de flebotomíneos fêmea que se infectam com *Leishmania spp.* ao realizarem o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados. Estas fêmeas infectadas podem transmitir o parasito posteriormente a outros hospedeiros susceptíveis como pessoas, outros cães e animais sinantrópicos (BRASIL, 2014a). No velho mundo os principais vetores da LV pertencem ao gênero *Phlebotomus* enquanto que no novo mundo pertencem ao gênero *Lutzomyia*, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a espécie de maior importância nas Américas (DUJARDIN et al., 2008; BATES et al., 2015). Além de o *L. longipalpis* ser o principal responsável pela transmissão da *L. infantum* no Brasil, encontram-se relatos na literatura de infecção deste flebótomo por outras espécies de *Leishmania spp.* causadoras da leishmaniose tegumentar (ALVAR et al., 2012). Porém não se sabe se este flebotomíneo participa na transmissão dessas outras espécies.

No momento da picada de flebotomíneos fêmea parasitados por promastigotas de *L. infantum*, também são inoculados a saliva do flebótomo e uma série de proteínas e lipofosfoglicanos (LPGs) que modulam a reação inflamatória local (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012; TEIXEIRA et al., 2014). A inflamação aguda causada por fatores ligados à saliva do flebótomo promove um recrutamento inicial de neutrófilos que são vitais para o sucesso da infecção por *L. infantum* (LESTINOVA et al., 2017). Este tipo celular, quando infectado por *L. infantum*, produz CCL2 de forma significativamente maior, atraindo macrófagos para a fagocitose destes neutrófilos infectados (PRATES et al., 2011). Assim, o parasita consegue aumentar significativamente a sua carga parasitária de forma silenciosa, contribuindo com o seu estabelecimento no indivíduo e

aumentando as chances de visceralização (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; LESTINOVA et al., 2017).

Além da saliva do flebótomo, outros fatores estão associados com a imunomodulação no local da picada, como a inoculação de LPGs encontrados no gel secretado por promastigotas, além de exossomos e bactérias liberados na picada juntamente com o parasito e a saliva (ROGERS et al., 2009; ATAYDE et al., 2015; DEY et al., 2018). Os LPGs produzidos por promastigotas dentro do intestino médio do flebótomo alteram o comportamento de alimentação do inseto, favorecendo repastos, mais longos, com maior volume de sangue ingerido e maior número de picadas por alimentação (ROGERS, 2012). Além disso, os LPGs também atuam na resposta inflamatória local do reservatório picado, exacerbando-a e assim contribuindo para o estabelecimento da infecção por *L. infantum* na grande quantidade de macrófagos recrutados (ROGERS et al., 2009). As promastigotas metacíclicas de *L. infantum* presentes na válvula estomodeal também secretam vesículas, exossomos, contendo proteínas com propriedades imunomodulatórias que também atuam no recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio inflamatório da picada (ATAYDE et al., 2015). Por fim, Dey e colaboradores (2018) estudaram o papel da microbiota intestinal do *L. longipalpis* na transmissão e infecção de *L. infantum*. Além de demonstrarem que as bactérias são inoculadas no momento da picada, foi possível observar que na presença delas, a infecção se estabelecia de forma mais rápida e causava lesões mais graves. A presença de bactéria no sítio da picada promove a ativação do inflamossoma nas células imunes no local com aumento da produção de IL-1 β (DEY et al., 2018). Esta interleucina, por sua vez, participa no recrutamento de neutrófilos que atuam de forma fundamental para o estabelecimento inicial da infecção (PETERS et al., 2008). A saliva do flebótomo também possui atividade imunomodulatória causando ativação de células T e macrófagos através da inibição de citocinas promotoras da resposta Th1 (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014).

Na literatura há relatos de outras formas de transmissão da LV como a via venérea, transplacentária ou por meio de transfusão sanguínea (MANSUETO et al., 2014; TURCHETTI et al., 2014). Existe a suspeita de transmissão por outros artrópodes como carrapatos e pulgas, porém esta ainda não foi comprovada (DANTAS-TORRES, 2011; NAUCKE; LORENTZ, 2012). No entanto, não é sabido ao certo a importância que tais formas de transmissão têm na epidemiologia da doença.

1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Em humanos a *L. infantum*, na forma de promastigota, é fagocitada por células do sistema fagocítico mononuclear, como o neutrófilo e principalmente macrófagos, presentes no tecido cutâneo no local da picada por flebotomíneos fêmea infectadas (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003). Os parasitos conseguem então escapar dos mecanismos de defesa destas células, sobrevivendo e se multiplicando dentro dos fagolisossomos, onde também se diferenciam na forma de amastigota (KAYE; SCOTT, 2011). Por meio da via linfática, a *L. infantum* se propaga em diversos órgãos linfáticos como linfonodos, baço e medula óssea, onde continuam a se multiplicar e, cronicamente, causam lesões (KUMAR; NYLÉN, 2012). Devido a estas lesões, é possível observar clinicamente alterações como esplenomegalia com presença de nódulos no baço, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia dentre outros sinais clínicos e laboratoriais (ALVARENGA et al., 2010).

A leishmaniose visceral humana (LVH) acomete principalmente crianças abaixo de 4 anos, idosos e pessoas imunodeprimidas (EVANS et al., 1985; ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996; MELCHIONDA et al., 2014). Diversos fatores como a presença de aves domésticas no peridomicílio e cães infectados no domicílio, vem sendo associados como fatores de risco para a LVH e leishmaniose visceral canina (LVC) (MORENO et al., 2005; BORGES et al., 2009; FERNÁNDEZ et al., 2010). Em um estudo realizado em área rural no Senegal, a presença de cães com LVC no domicílio aumentou em 5,56 vezes ($p < 0,0001$) o risco das pessoas serem soropositivas (FAYE et al., 2011). Em situação de baixa imunidade, más condições nutricionais e sanitárias, essas pessoas soropositivas podem desenvolver a forma clínica da doença (MOLINA, GRADONI e ALVAR, 2003).

Em relação à LVH, além dos fatores de risco anteriormente citados, más condições sanitárias e baixa renda favorecem o aumento da ocorrência da doença em ambientes semiurbanos (WERNECK et al., 2007; BOELAERT et al., 2009). De acordo com Cerbino Neto e colaboradores (2009) em Teresina entre 1991 e 2000 a incidência da LVH foi maior em áreas periféricas com alta cobertura vegetal, características urbano/rural, ocupação recente e desordenada por pessoas de baixa renda. Neste estudo destaca-se a infraestrutura como sendo um importante fator de risco tanto para os humanos quanto para cães, bem como para a expansão da doença em ambientes urbanos. As condições socioeconômicas também estão associadas com a incidência canina da doença (COURA-VITAL et al., 2011).

No Brasil, o tratamento da doença é recomendado pelo Ministério da Saúde com a utilização de antimoniato N-metil glucamina, anfotericina B desoxicolato e anfotericina B liposomal (BRASIL, 2014b). Levando-se em consideração a forma de administração, tempo de tratamento, remuneração dos profissionais de saúde e testes diagnósticos estima-se que o Sistema Único de Saúde gasta entre U\$ 418,20 e U\$ 11.559,15 por paciente (DE ASSIS et al., 2017).

1.4 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da LV, sendo também a principal fonte de infecção do vetor no meio urbano (MARCONDES; ROSSI, 2013). Em áreas endêmicas a infecção dos cães por *L. infantum* ocorre de forma generalizada em grande parte da população canina, porém muitos animais não desenvolvem a doença (DANTAS-TORRES, 2009). Nestas áreas onde há transmissão ativa da doença, a soroprevalência da população canina varia entre 3,4% a 40% (PRADO et al., 2011; PEIXOTO et al., 2015). De acordo com Baneth e colaboradores (2008), somente uma pequena parcela da população canina apresenta doença clínica, seguido de um grupo maior de cães sem sinais clínicos, porém sorologicamente positivos e por fim os animais sem sintomatologia e positivos por meio de técnicas moleculares. A prevalência canina em uma área endêmica é relacionada na literatura, com a alta densidade das populações canina e flebotomínea neste local (COURA-VITAL et al., 2013). Outros fatores também estão associados com a taxa de infecção de cães, tais como o grau de exposição ao flebótomo, comportamento do animal, medidas de prevenção aplicadas pelos proprietários dos cães e susceptibilidade da população canina (DANTAS-TORRES et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013).

As promastigotas de *L. infantum* inoculadas na pele do animal por meio da picada de flebotomíneos infectados, são fagocitadas por macrófagos e através de mecanismos de defesa, sobrevivem dentro do fagolisossomo e se multiplicam (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Por meio da corrente sanguínea e cadeia linfática os parasitos conseguem infectar órgãos como o baço, fígado e medula óssea, assim como os linfonodos e pele (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Nestes órgãos os parasitos causam lesões e alterações que comprometem o funcionamento do mesmo e provocam os principais sinais clínicos da doença. É descrito na literatura que em cães com doença severa, há um alto grau de desorganização na polpa branca do baço causada pela infecção *L. infantum* (LIMA et al., 2014). Conseqüentemente esses cães possuem uma resposta imune comprometida, uma vez que esta região do baço é responsável

pela maturação dos linfócitos B, favorecendo o desenvolvimento de coinfeções como a babesiose e erliquiose.

De forma distinta do que ocorre nos casos de LVH, no cão os parasitos também estão presentes na pele, causando uma série de lesões características da LVC. Destacam-se a dermatite furfurácia, onicogribose, úlcera em ponta de orelha, despigmentação e hiperqueratose no focinho dentre outros sinais clínicos (SOARES et al., 2011). O parasitismo cutâneo da LVC está diretamente relacionado com capacidade de transmissão que estes animais possuem e por isso são considerados como o principal reservatório urbano da doença (DANTAS-TORRES, 2009). Além dos sinais clínicos cutâneos, o cão também apresenta alterações hematológicas como a hipergamaglobulinemia e anemia e lesões características de uma doença crônica como a glomerulonefrite imunomediada e uveíte (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O cão infectado pode apresentar uma resposta imune predominantemente do tipo celular ou humoral. A resposta imune celular confere ao animal melhor capacidade de eliminar o parasito intracelular e, conseqüentemente, o cão que apresenta predominância desse tipo de resposta, possui menor parasitemia e geralmente não apresenta sinais clínicos (BANETH et al., 2008). Quando a resposta imune predominante é do tipo humoral, há produção excessiva de anticorpos que não são eficazes na eliminação do parasito que é intracelular. Por conta do excesso de anticorpos no organismo, o cão apresenta uma série de patologias originadas pelo acúmulo de imunocomplexos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Existem relatos de predominância de diferentes respostas nas diferentes raças caninas, foi observado que cães da raça Podengo Ibicenso possuíam uma resposta imune primariamente do tipo celular e raramente desenvolviam a doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Alguns anos após este achado, foram identificados genes em cães susceptíveis que podem estar associados a susceptibilidade sendo a resposta imune destes cães predominantemente do tipo humoral (ALTET et al., 2002). Cães das raças Boxer, Pastor Alemão, Cocker Spaniel e Rottweiler são considerados como mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença quando infectados, sendo apontados esses genes de susceptibilidade como uma possível causa para grande ocorrência de LVC nessas raças (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Outros fatores como a condição nutricional do cão e coinfeções com outros parasitos também influenciam a susceptibilidade do cão em desenvolver a doença (BANETH et al., 2008).

Assim como o cão, outras espécies de mamíferos também albergam o parasito e servem como fonte de infecção da doença em ambientes tanto urbanos quanto periurbanos, como

gambá, gato, pequenos roedores e raposas (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Um gato (*Felis catus*) cronicamente infectado foi avaliado por xenodiagnóstico quanto a capacidade de transmitir a *L. infantum* ao flebótomo (MAROLI et al., 2007) e foi possível observar a presença do parasito em quatro das 19 fêmeas de flebotomíneos alimentadas utilizadas no xenodiagnóstico, porém não se sabe ao certo qual o papel real do gato na transmissão da LV.

1.5 XENODIAGNÓSTICO

O xenodiagnóstico é uma técnica utilizada em estudos de transmissibilidade em diversas enfermidades como na doença de Chagas, doença de Lyme e também nas leishmanioses (VERGEL et al., 2006; CAMPOS et al., 2007; BOCKENSTEDT; RADOLF, 2014). Em relação à leishmaniose visceral canina, esta é a única técnica diagnóstica capaz de avaliar a capacidade de transmissão de um cão infectado por *Leishmania infantum* para o flebótomo (GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2018). Para o xenodiagnóstico, fêmeas de flebotomíneo, não infectadas, criadas em laboratório são colocadas para realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, como o cão, homem, gato e gambá (MAROLI et al., 2007).

A depender de como é realizado o repasto sanguíneo, o xenodiagnóstico pode ser categorizado como direto, com o vetor se alimentando na pele do hospedeiro, ou indireto, por meio artificial de alimentação utilizando sangue do hospedeiro (MOLINA, GRADONI e ALVAR, 2003). No xenodiagnóstico direto, insetos não infectados criados em laboratório são postos para realizarem o repasto sanguíneo diretamente no hospedeiro. Enquanto que no xenodiagnóstico indireto, a alimentação sanguínea do inseto é realizada por meio de um aparato artificial utilizando-se o sangue do hospedeiro e uma membrana, por onde o repasto é realizado (VERGEL et al., 2006). É descrito na literatura que a forma indireta de xenodiagnóstico não se aplica para estudos da capacidade de transmissão de cães infectados por *L. infantum*, dado que em comparação com a forma direta, a sua eficiência é inferior e fatores associados ao repasto sanguíneo, como a parasitemia da pele e sangue periférico, são excluídos (GUARGA et al., 2000). Dessa forma, a transmissibilidade de um hospedeiro é melhor avaliada por meio da técnica de xenodiagnóstico direto, tendo em vista que esta, se encontra mais próximo da forma natural de transmissão da doença. Diversas metodologias aplicadas na técnica direta de xenodiagnóstico estão descritas na literatura, com alterações como a forma em que o hospedeiro é exposto ao vetor, no tempo do repasto sanguíneo e na quantidade de insetos utilizados no exame (COURTENAY et al., 2002; MIRÓ et al., 2011; SOARES et al., 2011). Essas alterações estão associadas com a tentativa de melhorar a sensibilidade da técnica, aumentando-se a taxa

de alimentação dos flebótomos utilizados no repasto sanguíneo, uma vez que maiores são as chances de detecção do parasito quanto maior for o número de fêmeas alimentadas. Na tabela 1, estão expostas as diferenças metodológicas supracitadas aplicadas em diversos trabalhos da literatura que utilizaram o xenodiagnóstico na avaliação da transmissibilidade de cães sintomáticos e assintomáticos.

Tabela 1: Diferenças metodológicas de xenodiagnósticos realizados em cães infectados por *L. infantum* encontradas na literatura.

Autor	Forma de exposição	Nº de flebotomíneos utilizados	Tempo de alimentação	Deteção do parasito	Momento de avaliação da infecção	Resultado quanto a capacidade de transmissão
Molina et al., 1994	Cabeça do animal em gaiola	50-75 fêmeas 50-75 machos	60 min	Observação direta	7°-8° dia	Assintomático = Sintomático
Travi et al., 2001	Localizada com recipiente	30-60 fêmeas	30 min	Observação direta	5°-7° dia	Assintomático < Sintomático
Da Costa-Val et al., 2007	Localizada com recipiente	40-45 fêmeas 40-45 machos	40 min	Observação direta	5° dia	Assintomático < Sintomático
Michalsky et al., 2007	Localizada com recipiente	20 fêmeas	30 min	PCR	5° dia	Assintomático < Sintomático
Verçosa et al., 2008	Localizada com recipiente	60 fêmeas	45 min	Observação direta	5° dia	Assintomático < Sintomático
Soares et al., 2011	Localizada com recipiente	60 fêmeas	45 min	Observação direta + PCR	5° dia	Assintomático < Sintomático
Laurenti et al., 2013	Localizada com recipiente	50 fêmeas	60 min	Observação direta + PCR	4° dia	Assintomático > Sintomático
Courtney et al., 2014	Todo o corpo do animal em gaiola	8-160 fêmeas 8-160 machos	Durante toda a noite	Observação direta	4°-5° dia	Assintomático < Sintomático
Borja et al., 2016	Localizada com recipiente	30-40 fêmeas 10-15 machos	40 min	qPCR	5° dia	Assintomático = Sintomático
Magalhães-Junior et al., 2016*	Localizada com recipiente	G1 e G3: 40 fêmeas e 15 machos G2: 40 fêmeas	30 min	G1 e G3: PCR G2: Observação direta	G1 e G3: 5° dia G2: 10° dia	Assintomático < Sintomático

* Neste estudo foram aplicadas diferentes metodologias sendo a mesma aplicada nos grupos 1 e 3 (G1 e G3) que foi deferente daquela aplicada no gupo (G2).

Em alguns trabalhos o cão é sedado havendo exposição da cabeça do animal ou de todo o seu corpo aos flebotomíneos (MIRÓ et al., 2011; COURTENAY et al., 2014). Neste caso, todo o corpo do cão ou a parte dele permanece dentro de uma gaiola com flebótomos, possibilitando que estes realizem o repasto sanguíneo onde for mais atrativo. Em outros estudos, o contato dos flebotomíneos com o cão é realizado de forma mais localizada, porém mais distante do que aconteceria naturalmente (DE SOUSA GONÇALVES et al., 2016; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; REGINA-SILVA et al., 2016). Neste caso os flebotomíneos, fêmeas e machos, são colocados dentro de um recipiente pequeno que é então colocado em contato com áreas específicas do corpo do animal: orelha, abdômen, focinho, etc. (MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011; BORJA et al., 2016). O tempo de exposição e a quantidade de fêmeas utilizadas no xenodiagnóstico também variam bastante na literatura (MIRÓ et al., 2011; SOARES et al., 2011; COURTENAY et al., 2014).

Há estudos em que o repasto sanguíneo foi realizado por 15 min e em outros ocorreu repasto durante toda a noite (overnight) (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003; COURTENAY et al., 2014). Essa variação na duração está relacionada com a tentativa de se obter maior taxa de alimentação (número de fêmeas alimentadas / número total de fêmeas), fator que está associado com a sensibilidade da técnica, uma vez que maiores são as chances de detecção do parasito quanto maior for a taxa de alimentação das fêmeas utilizadas. Na literatura encontram-se estudos que utilizaram até 160 fêmeas de flebótomo em cada xenodiagnóstico realizado, enquanto que em outros trabalhos a quantidade de fêmeas é bem menor, variando entre 40 a 60 (MIRÓ et al., 2011; SOARES et al., 2011; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Essas variações também estão relacionadas a espécie de flebótomo utilizada, dado que o *L. longipalpis* é mais agressivo ao se alimentar em um hospedeiro do que o *Phlebotomus perniciosus*, sendo então necessário menos fêmeas para realizar o xenodiagnóstico com *L. longipalpis* (MAIA et al., 2011).

Outra característica da técnica de xenodiagnóstico que varia bastante na literatura é a forma como a infecção do vetor é detectada (GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2001; MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011). A identificação do parasito nas fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo pode ser feita de forma direta, por meio da dissecação do flebótomo seguida da observação direta de promastigotas no intestino do inseto através da microscopia óptica (GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2001; MIRÓ et al., 2011). Com a exposição do intestino médio seguida da observação direta de parasitos por microscopia óptica, observa-se tanto a quantidade de parasitos, quanto a sua motilidade, estágio de desenvolvimento

e localização (KAMHAWI, 2006). Porém a sensibilidade dessa técnica é variável dependente do grau de treinamento do profissional para realização da dissecação e detecção do parasito (MYSKOVA; VOTYPKA; VOLF, 2008; MIRÓ et al., 2011). Outra forma de identificação é indireta, pela realização da PCR para detectar a presença do DNA do parasito no interior do inseto (MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011). Com esta técnica molecular é possível detectar o kDNA da *L. infantum* com alta sensibilidade e especificidade, além de quantificá-lo (SOLCÀ et al., 2014). Porém essa técnica tem limitações como a incerteza de se o kDNA detectado foi advindo de um parasito vivo, além da impossibilidade de determinação do estágio em que o parasito se encontrava e se ele estava com boa motilidade.

Soares e colaboradores (2011) realizaram a técnica de PCR após a observação direta e detectaram kDNA de *L. infantum* em flebótomos nos quais não foram encontrados parasitos na dissecação. Estes autores também ressaltaram a importância de acrescentar a avaliação molecular após a dissecação para aumentar a sensibilidade da técnica e diminuir o número de falsos negativos. Myskova, Votypka e Volf (2008) realizaram um experimento sob condições artificiais de alimentação utilizando um alimentador de vidro, pele de pinto e sangue infectado com altas cargas de *L. infantum* (5×10^5) com a finalidade de se avaliar o melhor momento após o repasto sanguíneo para a detecção do material genético do parasito. Eles observaram que a qPCR teve melhor capacidade de identificar e quantificar o parasito no intestino do flebótomo no segundo e oitavo dia após o repasto sanguíneo.

O momento em que a detecção é realizada também está relacionado com a sensibilidade do xenodiagnóstico. Em alguns estudos a detecção do parasito no intestino do flebótomo é realizada no quarto ou quinto dia após o repasto sanguíneo (MICHALSKY et al., 2007; LAURENTI et al., 2013). De acordo com Kamhawi (2006) este período corresponde ao momento logo após a defecação dos flebótomos. Junto com o sangue digerido boa parte dos parasitos que não se aderiram ao epitélio do intestino médio do flebótomo são excretados, diminuindo assim a sensibilidade do xenodiagnóstico, caso a detecção seja realizada neste período. Ainda de acordo com esta autora, a detecção do parasito é mais sensível quando realizada antes da defecação (segundo dia) ou depois (a partir do sétimo dia após o xenodiagnóstico), quando é possível encontrar maior número de parasitos na forma metacíclica.

1.6 INFECTIVIDADE DO CÃO

No que diz respeito a infectividade do cão, a literatura se mostra bastante controversa. Travi e colaboradores (2001) correlacionaram a evolução clínica do cão com a capacidade de transmissão agrupando os animais em assintomáticos (sem sinais clínicos da doença), oligosintomáticos (1 ou 2 sinais clínicos) e polisintomáticos (> 2 sinais clínicos). Neste estudo, nenhum dos animais considerados assintomáticos foi infectivo para o *L. longipalpis*. No entanto, em outros trabalhos se observou que estes cães aparentemente sem sinais clínicos também são capazes de transmitir a *Leishmania* ao flebótomo, porém em menor proporção (COURTENAY et al., 2002; MICHALSKY et al., 2007). Entretanto a correlação entre a sintomatologia e a infectividade não pode ser generalizada, pois a classificação clínica dos animais varia bastante entre os trabalhos encontrados na literatura. Geralmente são observados somente os sinais clínicos externos sem avaliação laboratorial complementar, além do viés de que alguns sinais poderiam estar ocorrendo devido à presença de coinfeções como babesiose e erliquiose. Solano-Gallego e colaboradores (2011) sugerem que outras análises clinico-patológicas como as proteínas totais no sangue, uréia, creatinina, função renal e hepática, devem ser avaliadas em conjunto com os sinais clínicos exteriorizados pelo cão para melhor classificar seu estadiamento clínico. Dessa forma, a categorização clínica seria mais próxima do estágio clinico-patológico no qual o cão realmente se encontra.

Outros pesquisadores procuraram correlacionar a capacidade de transmissão do cão ao vetor com outras características dos animais, como Courtenay e colaboradores (2002) que avaliaram a correlação entre a capacidade de transmissão do cão, verificada pela técnica de xenodiagnóstico, e a presença do parasito na medula óssea e a soropositividade. Neste estudo, a detecção de kDNA de *L. infantum* em medula óssea aumentou em 5 vezes as chances do cão ser infectivo para o flebótomo, no entanto a correlação neste caso foi fracamente positiva (r^2 0,123). Em outros estudos, altos níveis de IgG e IgG2 e baixas contagens de células T CD4+ (GUARGA et al., 2000) foram sugeridos como indicadores de alta infectividade dos cães aos flebótomos. Em seu estudo Borja (2016) correlacionou a carga parasitária na pele, baço e sangue de cães infectados por *L. infantum*, a fim de identificar o tecido mais apropriado como marcador de infectividade. O sangue foi o único tecido que apresentou correlação positiva entre sua carga parasitária e o número de parasitos transmitidos. Assim como no estudo de Borja (2016) outros trabalhos encontraram correlação positiva entre a carga parasitária em diversos tecidos e a infectividade do cão ao flebótomo (RIBEIRO et al., 2008; MIRÓ et al., 2011).

Entretanto se fazem necessário mais estudos com esse tipo de correlação, com o intuito de identificar algum tecido como marcador de infectividade do cão.

1.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LVC é complexo e laborioso, uma vez que cães infectados por *L. infantum* apresentam um espectro de sinais clínicos e alterações hematológicas variadas e não específicas que podem ser confundidas com outras enfermidades crônicas, como a babesiose e erliquiose (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; VERAS et al., 2014). Assim, se faz necessário uma abordagem mais abrangente para o diagnóstico da doença, buscando-se vestígios da infecção por meio de técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A população de cães assintomáticos se mostra mais desafiadora para o diagnóstico da LVC, dado que estes animais possuem menor reatividade para técnicas sorológicas comumente empregadas e menor parasitemia em tecidos menos invasivos como o sangue (BANETH et al., 2008; FRAGA et al., 2016). Dessa forma, técnicas diagnósticas com altas sensibilidade e especificidade se fazem necessárias.

A avaliação parasitológica por meio de citologias ou culturas de amostras de diversos tecidos é altamente específica, sendo o isolamento em cultura de material biológico considerado como padrão ouro (ALMEIDA et al., 2013). No entanto, o cultivo da *L. infantum* demanda tempo, possui baixa sensibilidade e está sujeito a contaminações por bactérias e/ou fungos que podem levar a resultados falso negativos (BARROUIN-MELO et al., 2004). Diferentemente dos exames parasitológicos que visam à observação direta do parasito por meio da microscopia óptica, as técnicas moleculares se enquadram nos critérios de sensibilidade e especificidade supracitados (MAIA et al., 2009). Além disso, elas permitem tanto a detecção do material genético da *L. infantum*, quando utilizadas PCRs convencionais, quanto à quantificação da carga parasitária em diversos tecidos, quando empregadas PCRs quantitativas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TRAVI et al., 2018).

Na literatura, são encontrados diversos alvos genéticos para o diagnóstico molecular de *L. infantum*, como regiões conservadas do DNA do cinotoplasto (kDNA), polimerase α , RNA ribossomal (18S) ou espaçador interno transcrito 1 (ITS1), entre o 18S e 5,8S ribossomal (LACHAUD et al., 2002; FRANCINO et al., 2006; BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011; TOZ et al., 2013). Devido ao alto número de cópias obtidas quando o kDNA é utilizado, este é considerado como o mais sensível (GOMES et al., 2008). Além da variação do alvo genético

encontrado na literatura, diversas técnicas moleculares foram empregadas, como PCRs convencionais seguidas de gel de agarose e eletroforese ou hibridização e PCR quantitativas (qPCR), apresentando sensibilidades e especificidades distintas (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; SOLCÀ et al., 2012; RAMPAZZO et al., 2017). Dentre os métodos de PCR investigados na literatura, a qPCR se mostrou mais sensível e específica em comparação com a PCR convencional e a “semi nested” (REIS et al., 2013). Embora as técnicas moleculares apresentem alta performance frente a outras técnicas diagnósticas, o material biológico utilizado pode proporcionar resultados distintos com acurácias diferentes (TRAVI et al., 2018).

Materiais biológicos oriundos do baço são considerados mais sensíveis, tanto para diagnosticar cães assintomáticos quanto sintomáticos, uma vez que é possível encontrar o parasito neste órgão independente da forma clínica da doença (REIS et al., 2006). Entretanto, o acesso a esse tipo de amostra é considerado bastante invasivo com riscos de hemorragias e consequentemente morte do animal, porém estudos como de Barrouin-Melo e colaboradores mostram a segurança de sua realização (BARROUIN-MELO et al., 2004). Tanto a medula óssea quanto o linfonodo poplíteo se mostraram bastante sensíveis para a detecção do kDNA de *L. infantum* em um estudo realizado por Maia e colaboradores (2009). No entanto, esses autores ressaltam que a coleta dessas amostras biológicas necessita de condições assépticas e anestesia local ou geral, diferentemente do sangue que é muito menos invasivo. Entretanto, a PCR do sangue é menos sensível quando comparada com as amostras biológicas citadas anteriormente (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; SOLCÀ et al., 2014). Neste quesito de amostras menos invasivas, a pele pode ser uma alternativa dado que a sua coleta não necessita de pessoas treinadas e pode ser feita fora do ambiente clínico (RAMPAZZO et al., 2017).

Na literatura, foi demonstrado que a qPCR de biópsias de pele é tão sensível e específica quanto a qPCR de aspirado esplênico e possui acurácia similar a qPCR de medula óssea (ALMEIDA et al., 2013; REIS et al., 2013). No entanto, este dado diverge daqueles apresentados por outros estudos que encontraram sensibilidade e especificidades inferiores (LIMA et al., 2010; SOLCÀ et al., 2014). Esta diferença pode ter ocorrido devido a parasitemia na pele não ser distribuída de forma homogênea (DOEHL et al., 2017). Em cães, a infecção por *L. infantum* tende a permanecer nos locais onde flebotomíneos infectados inocularam os parasitos durante o repasto sanguíneo, dependendo da resposta imunológica do cão e do estágio clínico da doença (ASLAN et al., 2016). Dessa forma, Doehl e colaboradores (2017) indicam que o diagnóstico utilizando a pele como amostra biológica deve ser feito com biópsias de diversos locais da pele do animal, a fim de se aumentar a sensibilidade. Entretanto, as biópsias

de pele convencionais (BC) com punch de 3mm em determinados locais como a orelha e focinho do animal podem acarretar em sangramentos e feridas que necessitam de cuidados após o procedimento, restringindo assim os locais da pele que serviriam para coleta de amostra (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012).

1.8 MICROBIÓPSIA DE PELE

A microbiópsia de pele (MB) é descrita na literatura como uma alternativa não invasiva para o diagnóstico de neoplasias da pele como o melanoma (PROW; LIN; SOYER, 2013). Diferentemente da BC, a MB não necessita de anestesia, sutura após o procedimento e não provoca cicatriz (Figura 1)(LIN et al., 2013). A amostra de pele coletada é pequena (0,15mm), mas suficiente para a realização de análises moleculares (BANAN et al., 2013). Dessa forma a MB representa uma alternativa para a coleta de amostras de pele para a detecção do kDNA de *L. infantum* tanto de pessoas quanto de cães infectados. Recentemente, Kirstein e colaboradores (2017) testaram a MB para o diagnóstico da LV na Etiópia, sendo possível detectar o material genético de *L. donovani* e *L. aethiopica* com esta técnica minimamente invasiva. Em cães este tipo de abordagem ainda não foi testado, porém acredita-se que seja uma alternativa para o diagnóstico da LVC, possibilitando a coleta de amostras de diversos locais na pele do animal aumentando-se a sensibilidade como proposto por Doehl e colaboradores (2017). Além disso, a MB não apresenta os pontos negativos em relação a sangramentos, necessidade de anestesia e feridas após o procedimento que possui a BC com punch de 3mm (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012).



Figura 1: Imagem comparativa do local da pele após a realização da biópsia (à esquerda) e do tamanho do material (à direita) da biópsia convencional com punch de 3mm (BC) e microbiópsia de pele (MB). Modificado: Lin et al., 2013.

O aparelho de MB é capaz de coletar aproximadamente 1600 células da pele e um pouco do sangue local, pois seu modelo M2 possui uma camada absorvente (TOM et al., 2016; KIRSTEIN et al., 2017). O dispositivo para realização de MB está ilustrado na figura 2 onde é possível observar a comparação do seu tamanho com o de um punch de 3mm utilizado na BC (2A) e também com o de uma probóscide de um flebotomíneo (2C). Nas figuras 2B e 2D estão ilustrados o dispositivo de acionamento da MB e a diferença dos modelos MB1 e MB2. Dessa forma, a MB se aproxima bastante do que ocorre naturalmente na picada do flebótomo, que ao picar o hospedeiro danifica a pele com o auxílio de sua probóscide, ao mesmo tempo em que ingere o sangue acumulado no local da picada, e também ingere algumas células da pele (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014). Outra característica que favorece o uso da MB na avaliação da transmissibilidade de cães é o fato de que a técnica é mais prática e rápida quando comparada ao xenodiagnóstico, pois para sua realização necessita-se de menos de um minuto.

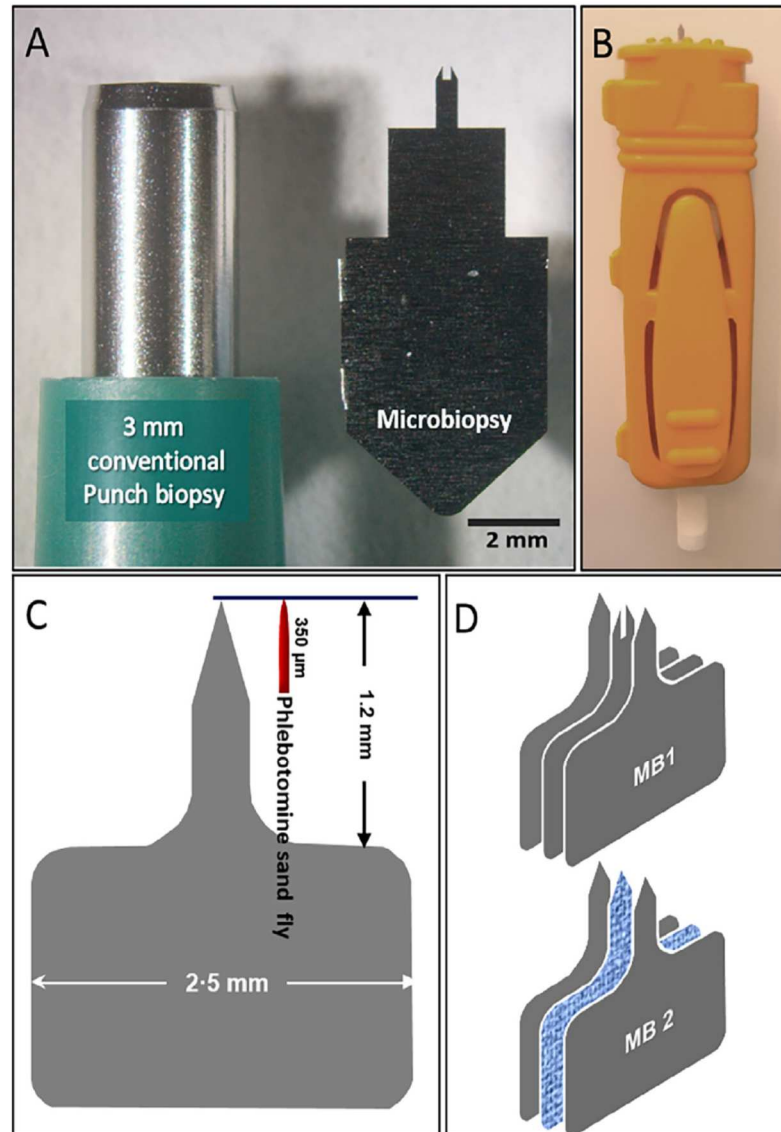


Figura 2: Comparação do tamanho do punch de 3mm utilizado na biópsia convencional de pele com a lâmina do dispositivo de microbiópsia (2A), ilustração do dispositivo de microbiópsia de pele (2B), comparação do tamanho da probóscide de um flebotomíneo com a ponta da MB que é inserida na pele (2C) e ilustração dos modelos MB1 que só coleta amostra de pele e MB2 com papel filtro interno para a absorção de sangue, que foi o utilizado neste estudo (2D). Fonte Kirstein et al., 2017.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Devido as diferenças metodológicas encontradas na literatura somadas com a necessidade de pessoas treinadas e capacitadas tanto para o cultivo quanto para dissecação de flebotomíneos, a técnica de xenodiagnóstico se torna bastante laboriosa e cara (MYSKOVA; VOTYPKA; VOLF, 2008). Em face as dificuldades descritas quanto a realização e padronização da técnica de xenodiagnóstico, faz-se necessária a busca por alternativas mais baratas e simples de avaliação da transmissibilidade de cães infectados por *L. infantum* para o flebótomo.

Não obstante, faz-se necessário a identificação de amostra biológica pouco invasiva para ser utilizada no diagnóstico da LVC como de locais da pele onde há focos de parasitos utilizando biópsias de pele (DOEHL et al., 2017). Novas técnicas diagnósticas com amostras pouco invasivas que sejam rápidas e práticas trariam um ganho para o controle da LV por permitirem a identificação precoce dos cães infectados com parasitemia cutânea e que possam estar participando no ciclo de transmissão da doença (VERÇOSA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013).

Uma alternativa minimamente invasiva para substituir o xenodiagnóstico e para o diagnóstico molecular com amostras de pele pode ser a técnica de MB que se assemelha bastante com a picada do flebótomo, sendo proposto na literatura para avaliar a capacidade de transmissão de cães para o vetor (KIRSTEIN et al., 2017). Assim, é possível avaliar a transmissibilidade de um maior número de cães em um menor tempo, com a MB, identificando-se rapidamente aqueles cães que realmente estão contribuindo para manutenção da doença. A avaliação da transmissibilidade após a MB pode ser realizada com avaliação molecular por PCR ou qPCR, podendo ser realizada com várias amostras ao mesmo tempo (PROW; LIN; SOYER, 2013). Dessa forma, a infecção por *L. infantum* em cães também pode ser detectada. Devido a semelhança com a picada do flebótomo, e a rapidez e praticidade no resultado, a MB pode ser uma boa alternativa para substituir o xenodiagnóstico na avaliação da transmissibilidade de cães infectados por *L. infantum*, bem como para o diagnóstico de CVL nestes animais.

Diante do exposto, a hipótese do presente trabalho é de que a microbiópsia de pele é igualmente capaz de determinar a capacidade de transmissão de cães infectados por *Leishmania infantum* para o vetor *Lutzomyia longipalpis* quando comparada com a técnica de xenodiagnóstico e também pode ser utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a utilização da microbiópsia de pele como alternativa para o xenodiagnóstico na avaliação da capacidade de transmissão de cães infectados por *Leishmania infantum* para seu vetor *Lutzomyia longipalpis* e para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia da microbiópsia de pele na avaliação da transmissibilidade de cães sintomáticos e assintomáticos infectados por *Leishmania infantum* para seu vetor.
- Correlacionar os resultados de avaliação da transmissibilidade obtidos quando foi utilizado o xenodiagnóstico ou a microbiópsia de pele.
- Comparar os resultados de transmissibilidade obtidos com as duas técnicas utilizadas em diferentes locais da pele do animal.
- Avaliar a eficácia da microbiópsia de pele como método diagnóstico alternativo em relação a biópsia convencional de pele.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*

Para o fornecimento de flebotomíneos para a realização do xenodiagnóstico, foi necessário iniciar e estabelecer uma colônia de *Lutzomyia longipalpis*. Foram realizadas capturas no município de Camaçari/Ba, onde em estudo prévio realizado no laboratório identificou-se mais de 98% dos flebotomíneos como sendo da espécie *L. longipalpis* (SOUSA, 2013). Para iniciar a colônia, o regime de capturas ocorreu semanalmente por três dias consecutivos entre os meses de março e maio de 2016. Pelo menos 5 fêmeas e 5 machos foram separados de cada dia de captura, a depender da quantidade capturada no dia, a fim de identificar as espécies de flebotomíneos encontradas. No laboratório, os flebotomíneos foram contabilizados e mantidos em gaiolas de malha fina medindo 10x10x10cm. Ao final do terceiro dia de captura de cada semana, todas as fêmeas foram alimentadas com hamsters (Golden Syrius) previamente anestesiados, sendo este procedimento aprovado pelo CEUA do IGM sob o protocolo 007/2016.

No dia seguinte ao repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas foram transferidas para potes plásticos (250mL) com o assoalho de gesso, para que elas pusessem os ovos. Após 6 dias, em média, os insetos mortos de cada pote foram retirados e os ovos foram lavados com hipoclorito de sódio 1% e álcool 70%, adaptando-se os métodos de esterilização de ovos encontrados na literatura (VOLF; VOLFOVA, 2011). Com este procedimento, objetivou-se eliminar possíveis patógenos, como bactérias, fungos e gregarinas oriundos do campo que pudessem interferir no desenvolvimento das larvas. Os ovos lavados foram transferidos para um novo pote com assoalho de gesso e então observados diariamente de acordo com metodologia descrita na literatura com algumas alterações como a temperatura, umidade e fotoperíodo, sendo mantidos à 25°C, >70% de umidade relativa do ar e sem fotoperíodo (MODI; TESH, 1983). A partir da eclosão dos primeiros ovos, as larvas foram alimentadas com uma mistura fermentada de ração e fezes de coelho (1:1) até que se tornassem pupas. Os primeiros adultos emergidos foram expostos a hamsters previamente anestesiados para o repasto sanguíneo junto com os flebotomíneos do campo. Isto ocorreu até o momento em que a colônia se estabeleceu e então decidimos que a colônia seria “fechada”, as capturas foram suspensas e somente fêmeas da própria colônia passaram a serem usadas para o repasto sanguíneo. Alguns adultos, machos e fêmeas, foram usados de cada pote, para a montagem de

lâminas seguida de identificação morfológica usando a chave de Galati (2003), a fim de confirmar que a espécie da colônia era de fato *L. longipalpis*.

Durante as três primeiras gerações da colônia, o número médio de ovos por fêmea alimentada em cada pote, número de machos e fêmeas emergidos, e a taxa de sobrevivência, foram contabilizados e calculados dividindo-se o total de adultos pelo número de ovos em cada pote e o número de fêmeas alimentadas. Esses dados foram coletados para proporcionar um monitoramento do crescimento da colônia. Devido ao crescimento rápido e exponencial, a contabilização de ovos e adultos de cada pote se tornou laboriosa e demandava muito tempo. Assim, o monitoramento da colônia, passou a ser realizado somente pela contagem do número de fêmeas alimentadas por semana que eram colocadas em potes para a postura de ovos. Por sua vez, a colônia continuou com seu crescimento exponencial, sendo necessário modificar novamente a forma de monitorar o crescimento da colônia. Assim, a contagem do número de potes de cada estágio: ovo, larva e adultos, passou a ser empregada para monitorar a colônia.

A medida que a colônia foi crescendo, tanto a gaiola utilizada com os adultos quanto os potes usados para as larvas, foram substituídas por versões maiores. Inicialmente foram utilizadas gaiolas pequenas de 10x10x10cm, devido à pouca quantidade de flebotomíneos capturados. A partir da segunda geração, foram empregadas gaiolas de acrílico medindo 25x25x25cm, tendo uma capacidade em torno de 1500 insetos. Em decorrência do crescimento exponencial, estas gaiolas foram substituídas por gaiolas ainda maiores medindo 40x40x40cm, por volta da oitava geração, com capacidade de albergar em torno de 4000 flebotomíneos. Inicialmente, as larvas foram criadas em potes plásticos de 250mL com o assoalho de gesso, onde eram colocados entre 1000 e 1500 ovos. Posteriormente esses potes foram substituídos por potes maiores de 500mL onde pode-se colocar um maior número de ovos, até uma estimativa visual de 5000 ovos.

4.2 SELEÇÃO DOS CÃES

O xenodiagnóstico e a MB foram realizados em cães avaliados previamente e incluídos em um estudo de coorte realizado no município de Camaçari, pelo Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro e Epidemiologia (LAIPHE), do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). Os cães foram selecionados aleatoriamente dentre os cães incluídos no estudo de coorte, o critério de inclusão foi a positividade para LVC confirmada por teste sorológico (DPP e ELISA), cultura

ou qPCR de aspirado esplênico. Todos os procedimentos realizados nos cães foram aprovados pelo CEUA do IGM sob o protocolo 014/2016.

Inicialmente foi realizado um teste piloto com 40 cães com o objetivo de testar a utilização das MBs e as condições de extração e qPCR com esse tipo de amostra. Em 26 destes cães, a MB foi realizada no mesmo dia no qual amostras de aspirado esplênico e pele utilizando a BC foram coletados para o estudo de coorte do qual os animais participavam e foram selecionados. Assim, os resultados obtidos na MBs em diferentes locais da pele do cão foi correlacionado com os resultados das qPCR do aspirado esplênico e BC.

Para comparar a MB com o xenodiagnóstico na determinação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, outros 35 animais foram selecionados posteriormente quando a colônia ficou em boas condições para iniciar a realização dos xenodiagnósticos. Dentre estes novos animais, sete foram avaliados no piloto também.

Com o intuito de comparar a carga parasitária da MB com a carga parasitária da BC, foram utilizados os resultados da MB e BC de 29 dos 35 animais avaliados no estudo de correlação entre a MB e o xenodiagnóstico. Nos 6 cães restantes a BC não foi realizada ou a amostra ainda não teve o DNA extraído para realização da qPCR. Para essa análise, também foram incluídos os 26 cães do teste piloto que tinham amostras de BC totalizando 55 animais.

Os cães foram avaliados clinicamente e classificados por escore, de acordo com o número de sinais clínicos bem como a gravidade de cada um. Ao final da avaliação clínica um escore clínico foi atribuído para cada animal somando-se as pontuações observadas quanto à presença e intensidade de sinais clínicos. Foram classificados como sintomáticos os cães que apresentaram escore maior que 3 e como assintomáticos os cães com escore igual ou menor que 3. Os sinais clínicos avaliados no exame clínico e utilizados para essa classificação por escore podem ser observados na tabela 2.

Os testes sorológicos (DPP e ELISA), parasitológico (cultura esplênica) e moleculares (qPCR de baço, sangue e pele) foram realizados para determinação da positividade para infecção por *Leishmania* nos animais. Foram considerados elegíveis para a realização do xenodiagnóstico, os animais sintomáticos e os assintomáticos com presença do protozoário *Leishmania infantum* detectados por pelo menos uma das técnicas diagnósticas supracitadas.

Tabela 2: Sistema de escore clínico utilizado para agrupar os cães em dois grupos, assintomáticos (escore ≤ 3) e sintomáticos (escore > 3).

Sinal Clínico	Pontuação		
	0	1	2
1. Estado Nutricional	Normal ou obeso	Magro	Caquético
2. Coloração Mucosas	Normal	Anêmico	---
3. Dermatite periocular	Ausente	Ao redor de um olho	Ao redor de dois olhos
4. Crostas em orelhas	Ausentes	Em uma orelha	Em duas orelhas
5. Úlceras em orelhas	Ausentes	Em uma orelha	Em duas orelhas
6. Despigmentação no Focinho	Ausente	Em menos que 1/3 do focinho	Em mais que 1/3 do focinho
7. Hiperqueratose no focinho	Ausente	Em menos que 1/3 do focinho	Em mais que 1/3 do focinho
8. Lesão no focinho	Ausente	Lesão inicial mucosa	Lesão maior ulcerada
9. Volume do Baço	Não palpável	Palpável	---
10. Onicogrifose	Ausente	Discreto aumento	Aumento expressivo
11. Alopecia	Ausente	Focal em alguns pontos do corpo	Mais que 1/3 do corpo
12. Dermatite furfurácea	Ausente	Focal em alguns pontos do corpo	Mais que 1/3 do corpo
13. Linfadenopatia	Ausente	Um ou dois linfonodos do mesmo par	Um ou dois linfonodos de pares diferentes

Antes da realização do xenodiagnóstico, o proprietário dos animais foi questionado se o cão foi banhado com algum produto químico repelente, inseticida ou que produza odor, ou ainda se foi utilizada coleira repelente contra algum inseto, pulga e carrapato. Nos casos de resposta afirmativa, foi solicitado que o cão fosse banhado até 3 dias antes do procedimento com sabão neutro. Tais medidas visaram evitar a interferência de produtos inseticidas ou com odor forte na taxa de alimentação dos flebótomos, assim como, na mortalidade dos insetos após o exame.

4.3 TESTE PILOTO DA MICROBIÓPSIA DE PELE

As MBs de pele foram realizadas com dispositivos MB2, descritos por Kirstein e colaboradores (2017) que também permitem a coleta de um pequeno volume de sangue, além da coleta de uma pequena amostra de pele (0,15mm). Para isso, foram selecionados 40 animais, sendo 14 assintomáticos e 26 sintomáticos. O dispositivo MB2 foi acionado em cada local

testado de cada cão, sendo mantido por alguns segundos para que a sua camada interna de papel absorvesse o sangue gerado por sua utilização. Após a realização da MB, as lâminas de metal foram retiradas dos dispositivos com o auxílio de pinças e tesouras previamente esterilizadas com álcool 70% (Figura 3). Em seguida foram colocadas em microtubos (1,5mL) contendo 200 μ L do reagente de extração ATL do kit de extração DNAeasy Blood&Tissue - Qiagen®, com a ponta contendo o material coletado em direção ao fundo do tubo, garantindo que todo o material da MB permanecesse submerso no ATL. Os tubos foram levados ao laboratório e acondicionados à -20°C até o momento da extração do DNA.

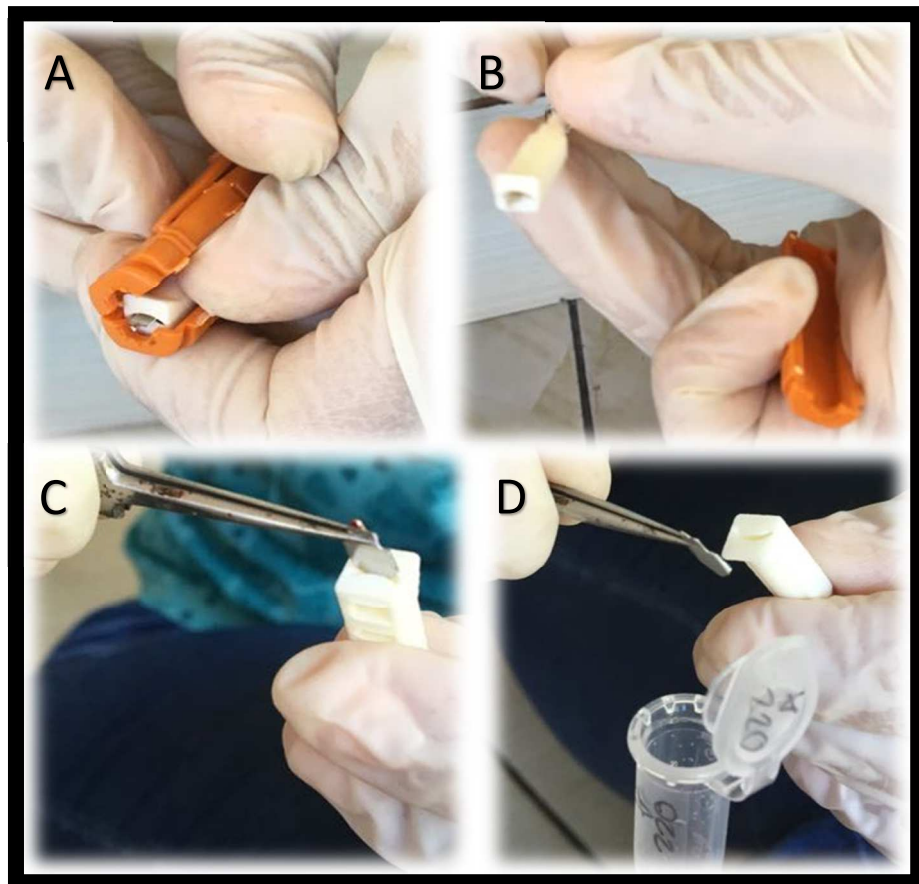


Figura 3: Manuseio do dispositivo de MB após a coleta da amostra de pele começando pela abertura do dispositivo (3A), retirada do plástico no qual as lâminas de metal com a amostra ficam inseridas (3B), retirada das lâminas contendo a amostra utilizando pinças previamente esterilizadas com álcool 70% (3C) e armazenamento em microtubos de 1,5mL contendo 200 μ L de reagente de extração (3D).

Com o objetivo de testar os melhores locais na pele de um cão para a detecção do DNA de *Leishmania*, foram realizadas MBs em diversos locais como o focinho, orelhas direita e esquerda, ombro, patas e abdômen (Figura 4). Também foram testados locais que tinham a

presença de lesões cutâneas características da LVC como nódulos, bordas de úlcera, e locais com despigmentação e alopecia.

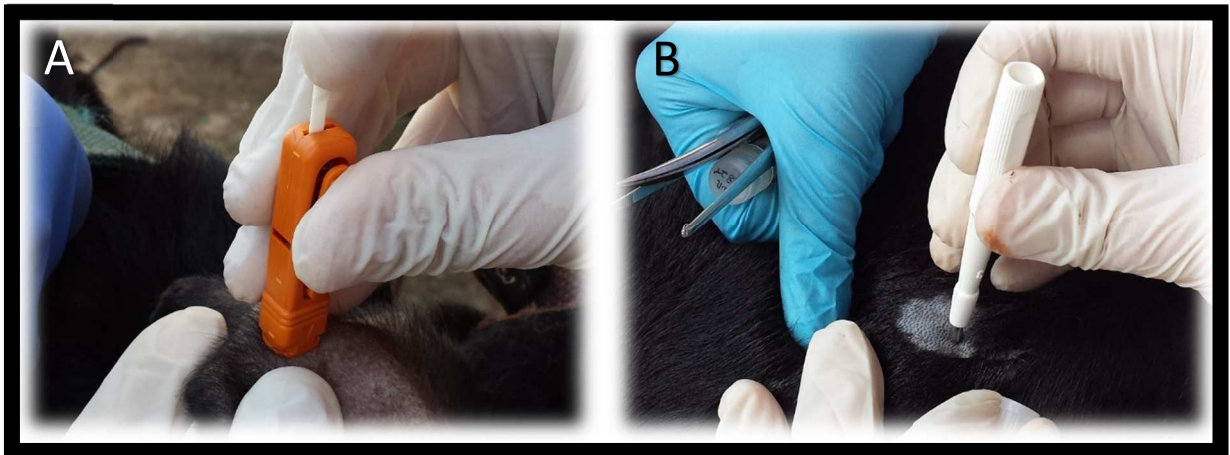


Figura 4: Realização da microbiópsia de pele na face interna da orelha esquerda de cão naturalmente infectado por *L. infantum* (4A) e da biópsia convencional com punch de 3mm no mesmo cão, sendo realizada na região escapular esquerda (4B).

4.4 XENODIAGNÓSTICO X MICROBIÓPSIA DE PELE

Utilizando os mesmos critérios de seleção anteriormente empregados, foram selecionados 20 cães sintomáticos e 15 assintomáticos para avaliação de correlação entre o xenodiagnóstico e a MB. Baseado nos testes com MB realizados anteriormente, a face interna da orelha esquerda do cão, o focinho e o abdômen (Figuras 5A e 5B) foram selecionados como os locais para realização. O primeiro sitio, a face interna da orelha, foi escolhido devido a sua rica vascularização, facilidade de manejo, o local possuir poucos pelos e por ser utilizado em diversos trabalhos encontrados na literatura, o que permite comparações. O focinho foi escolhido por ter sido o local com maior positividade na MB no estudo piloto realizado, pelo local possuir poucos pelos, ser bem vascularizado e ter frequentemente a presença de lesões cutâneas características de LVC. A escolha do abdômen para a realização do xenodiagnóstico se deu por este sitio ser distante dos outros dois sítios escolhidos e também por possuir poucos pelos. Tanto o xenodiagnóstico quanto a MB foram realizados nos mesmos locais em cada cão avaliado, sendo realizado primeiramente o xenodiagnóstico. Em relação à MB, foi aplicada a mesma metodologia de coleta descrita anteriormente.

Em cada xenodiagnóstico foram utilizadas entre 60 e 80 fêmeas com quatro a seis dias de idade. Para a realização do repasto, as fêmeas foram colocadas dentro de um recipiente próprio confeccionado no laboratório (Figura 5C). Por meio de uma malha fina, as fêmeas

tinham contato com a pele do animal por um período de 30 minutos, para que elas realizassem o repasto sanguíneo.

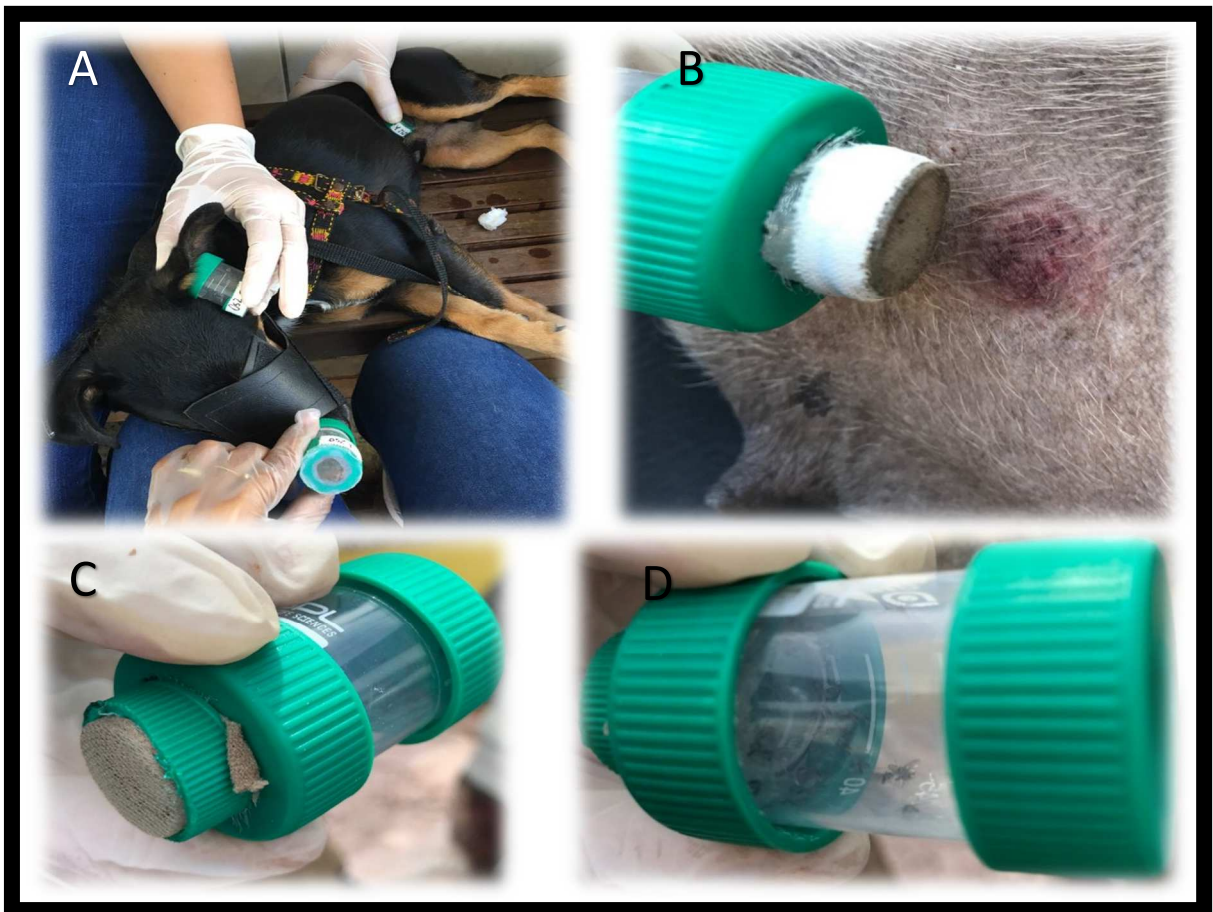


Figura 5: Sítios da pele usados para a realização do xenodiagnóstico e microbiópsia de pele, representando 5A: o focinho, face interna da orelha esquerda e abdômen, 5B: inflamação local após a realização do xenodiagnóstico, 5C e 5D: o recipiente utilizado no xenodiagnóstico no qual foram colocadas entre 60 e 80 fêmeas de flebotomíneo para a realização do exame.

Após a realização do xenodiagnóstico, as fêmeas de flebotomíneo foram levadas para o insetário do LaIPHE no IGM e foram então separadas quanto a realização de repasto sanguíneo durante o xenodiagnóstico. As fêmeas foram submetidas a CO₂ por um breve momento para que elas dormissem e então foram colocadas sobre um pote com gesso gelado para que demorassem a acordar. Dessa foram, as fêmeas alimentadas foram separadas e aquelas que não se encontravam alimentadas foram descartadas (Figura 6). Os insetos foram mantidos por até 10 dias sob condições controladas de temperatura (25°C +/-1°C) e umidade (>80%), alimentando-se de solução açucarada a 50%.

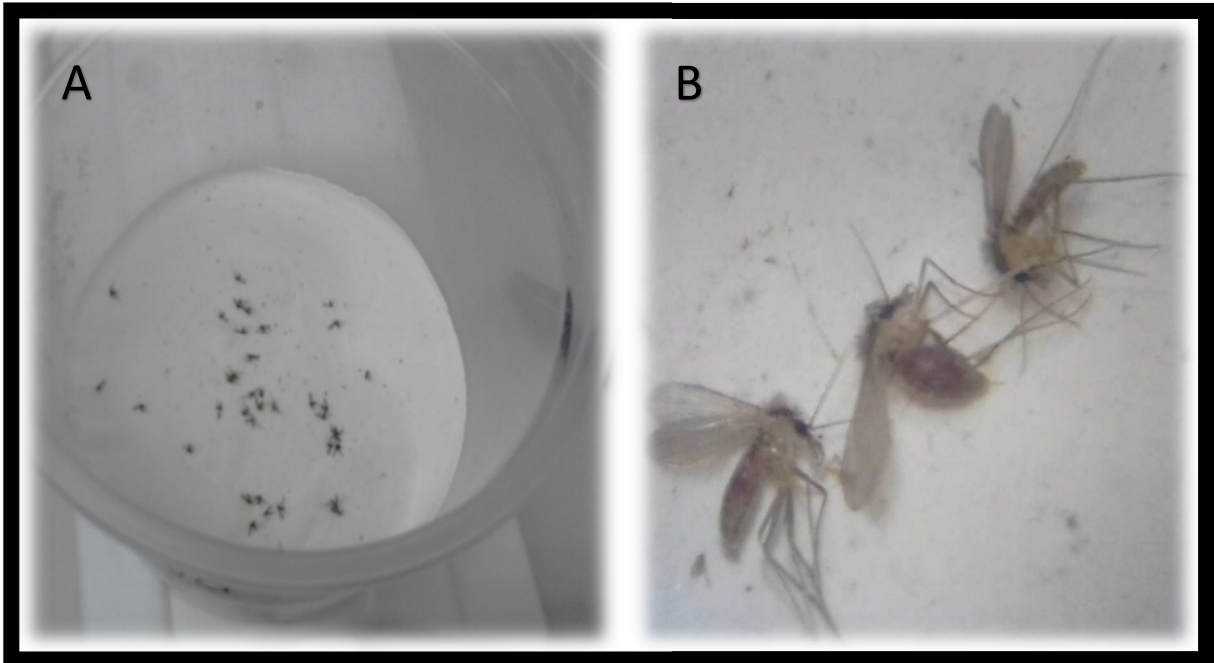


Figura 6: Separação das fêmeas de flebotomíneo alimentadas após o repasto sanguíneo no xenodiagnóstico com a representação dos insetos dormindo sobre o gesso do pote gelado durante a separação em 6A e três fêmeas observadas através do estereomicroscópio em 6B, sendo a da extrema esquerda considerada pouco alimentada, a do centro bem alimentada e a da extrema direita, não alimentada.

Foram utilizados potes plásticos de 500mL com algumas modificações para acomodar os flebotomíneos até que fossem feitas as dissecções. Dentre as modificações, foi realizado um furo na tampa que juntamente com uma malha fina fechava o recipiente, sendo colocado um pedaço de algodão embebido em solução açucarada em cima da malha como fonte de carboidrato e energia para os flebotomíneos. Outra modificação consiste em um segundo buraco na lateral do pote, onde foram coladas duas camadas de borracha com cortes vertical e horizontal em cada uma. Esses cortes na borracha foram sobrepostos de forma a impedir a fuga dos flebotomíneos e no lado externo havia uma “porta” feita com fita adesiva para garantir o fechamento do pote (Figura 7). Dentro do pote foram colocados dois pedaços de papel toalha e um pequeno pote com gesso umedecido para garantir a alta umidade e servir de substrato para a postura dos ovos. Os potes foram armazenados em caixas plásticas de 9,3L, sendo agrupados em três potes por caixa, representando os três xenodiagnósticos de cada cão. Para garantir a alta umidade dentro da caixa plástica, foram utilizadas esponjas umedecidas. A cada dois dias as caixas e potes foram observados, trocando-se o pedaço de algodão com solução açucarada, umedecendo as esponjas e pequenos potes com gesso dentro dos potes e retirando os flebotomíneos mortos.

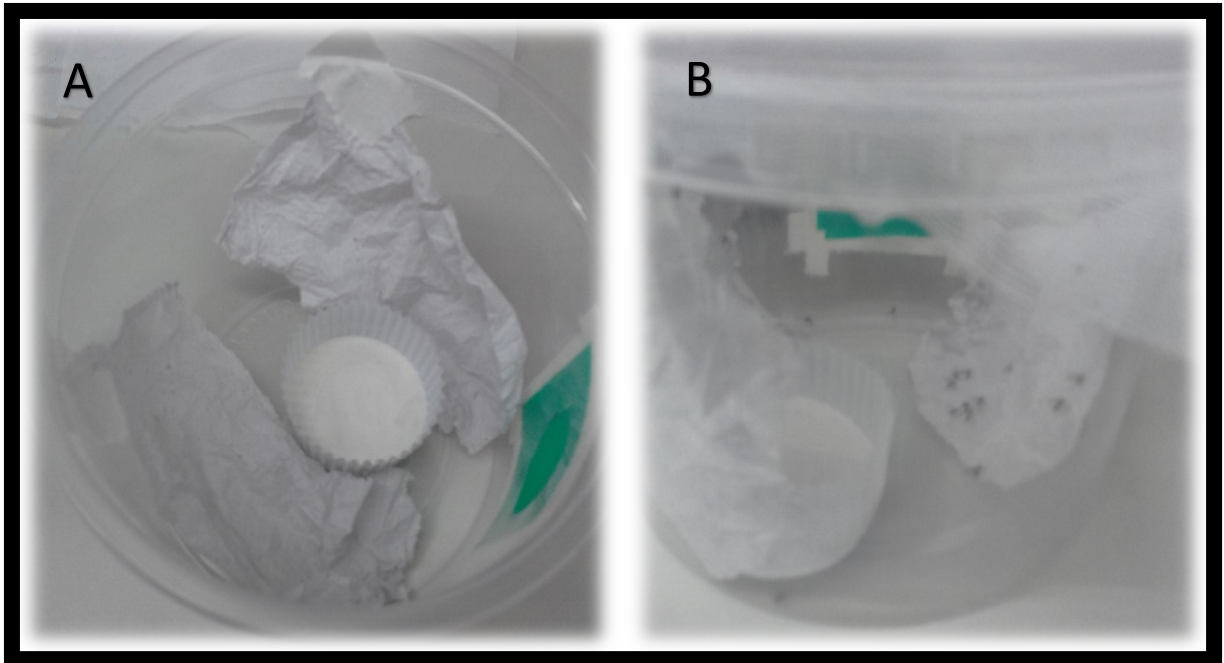


Figura 7: Recipientes utilizados para manter os flebotomíneos após a separação das fêmeas alimentadas até a realização das dissecções, sendo representado o interior do pote com um pequeno pote de gesso e papéis afixados nas paredes em 7A e algumas fêmeas de flebotomíneo alimentadas pousadas sobre papel toalha após a separação das mesmas em 7B.

Com o intuito de monitorar a infecção de *L. infantum* no intestino dos flebotomíneos, as fêmeas foram avaliadas em três momentos após o repasto sanguíneo. No primeiro, foram separadas 5 fêmeas alimentadas de cada local testado após em média 4h da realização do xenodiagnóstico, para avaliar por meio da qPCR se a quantidade de parasita detectada com a MB é comparável com a quantidade que um flebotomíneo ingere no repasto sanguíneo. No segundo ponto de avaliação da infecção, cinco fêmeas tiveram seus intestinos dissecados entre o segundo e terceiro dia após o repasto sanguíneo, com a finalidade de detectar a presença de *L. infantum* no intestino dos flebotomíneos (Figura 8). Por fim, no terceiro ponto do xenodiagnóstico, 15 fêmeas ou todas as sobreviventes tiveram seus intestinos expostos e avaliados entre o oitavo e décimo dia com o intuito de se avaliar o estabelecimento da infecção por *L. infantum* e a presença de parasitas metacíclicas infectantes (Figura 8). Nas situações onde mais de 15 fêmeas sobreviveram até o último momento de avaliação, as fêmeas excedentes foram acondicionadas à -20°C em microtubos de 1,5mL contendo 200 μL de ATL para posterior extração de DNA e PCR seguindo a mesma metodologia aplicada nas fêmeas separadas no primeiro ponto de avaliação do xenodiagnóstico.

Para a dissecação no segundo e terceiro ponto de avaliação da infecção de *L. infantum*, as fêmeas de flebotomíneo foram sugadas com aspirador e expiradas em solução diluída de detergente com o auxílio de um capturador manual, sendo dessa forma sacrificadas. Após o sacrifício as fêmeas foram lavadas, para remoção do detergente e colocadas em solução salina estéril para manutenção da osmolaridade até serem dissecadas. A dissecação e exposição do intestino foram realizadas em lâminas de vidro com auxílio de pinças entomológicas em um estereomicroscópio, enquanto que a procura e identificação das formas promastigotas foram realizadas em microscópio óptico na objetiva de 40X (Figura 8).

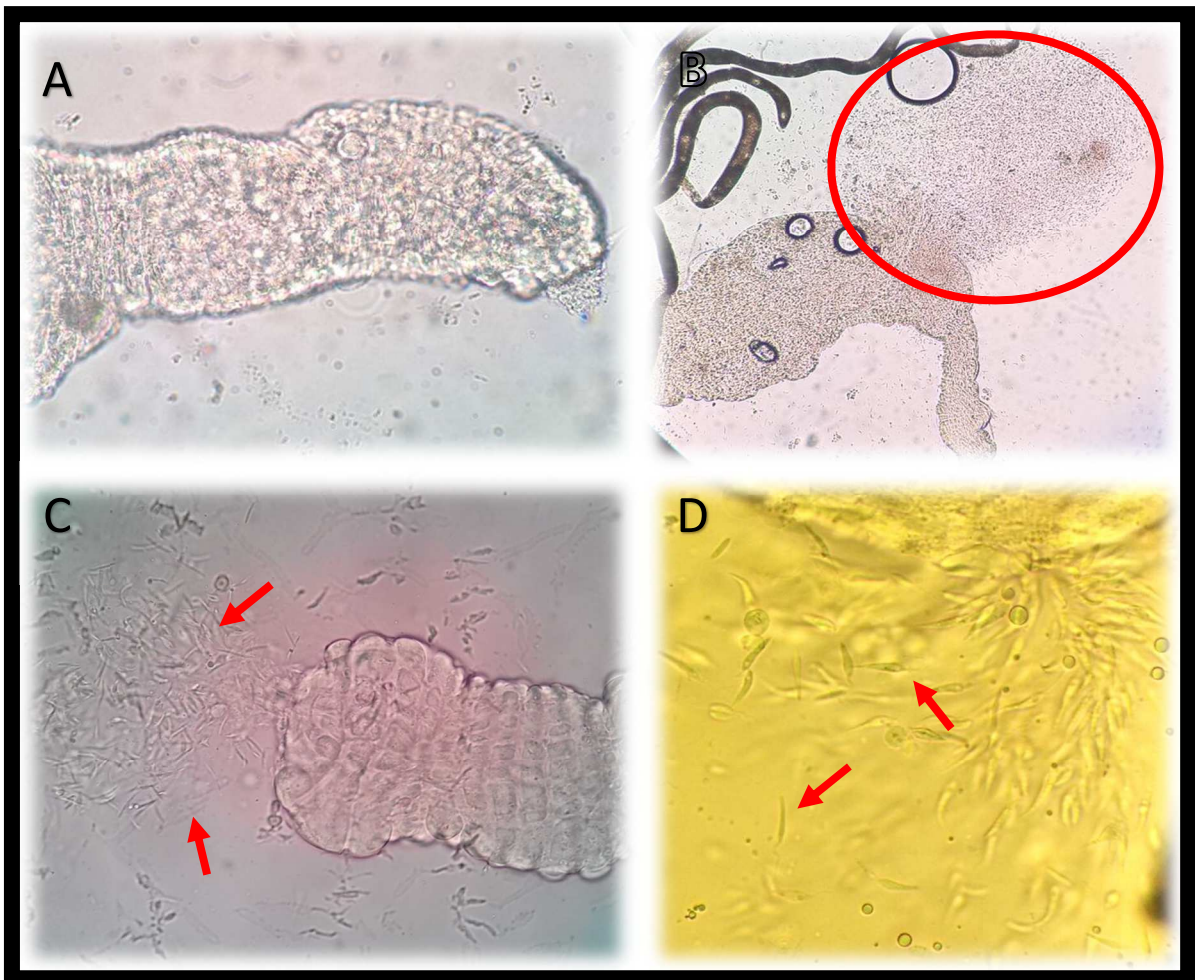


Figura 8: Observação dos intestinos dissecados por meio de microscopia óptica, sendo um intestino sem a presença de parasitos (40x) representado em 8A, uma massa de parasitos (círculo vermelho) saindo de um intestino médio infectado (10x) em 8B, formas promastigotas de leishmania (setas vermelhas) saindo da válvula estomodeal (40x) após 8-10 dias da realização do xenodiagnóstico em 8C, e também formas promastigotas (setas vermelhas) próximo ao intestino dissecado 2 dias após o repasto sanguíneo (8D).

4.5 BIÓPSIA CONVENCIONAL DE PELE

Para testar o desempenho da MB como uma técnica alternativa para o diagnóstico da LVC, BC utilizando punch de 3mm (Kolplast, Brazil) foram realizadas nos mesmos cães avaliados com a MB e xenodiagnóstico. As BCs foram realizadas na escapula esquerda do cão de acordo com o padronizado e estabelecido no laboratório (RAMPAZZO et al., 2017). Após a retirada, a amostra de pele foi manuseada com pinças esterilizadas com álcool 70% e colocadas dentro de criotubos (2mL) contendo 50µL de salina e armazenadas no laboratório à -20°C.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

4.6.1 Microbiópsia de pele

Para a extração do material genético das MBs, foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante do kit de extração DNAeasy Blood&Tissue – Qiagen. Foram adicionados 20µL de proteinase k em cada tubo, sendo estes então incubados a 56°C por três horas em banho maria. Após a incubação, foram seguidos os mesmos procedimentos preconizados pelo fabricante. Ao fim da extração, o material genético foi eluído em 50µL do eluente fornecido pelo próprio kit.

4.6.2 Biópsias convencionais de pele

O material genético das amostras de pele obtidas por BC da região escapular esquerda do cão com punch de 3mm foi extraído de acordo com metodologia previamente padronizada no laboratório, também utilizando o kit DNAeasy Blood&Tissue - Qiagen® (RAMPAZZO et al., 2017).

4.7 PCR QUANTITATIVA

Foi utilizada PCR quantitativa em sistema duplex para a detecção do kDNA de *L. infantum* nas amostras de BC e MB. Com essa metodologia, tanto o kDNA de *Leishmania* quanto o gene 18S de mamíferos foram investigados na mesma reação de acordo com o descrito por Rampazzo e colaboradores (2017). As amostras foram testadas em triplicata e consideradas positivas quando apresentaram Ct <40 na reação para detecção do kDNA e possuíam DNA integro e viável, apresentando Ct entre 12 e 25 para na reação para detecção do 18S.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A taxa de alimentação nos xenodiagnósticos foi calculada dividindo o número de flebotomíneos fêmea alimentados pelo número de fêmeas utilizadas no xenodiagnóstico (entre 60 e 80).

A taxa de infecção nos xenodiagnósticos foi determinada pelo número de intestinos com a presença de promastigotas de *L. infantum* dividido pelo número total de intestinos dissecados do mesmo ponto de avaliação. Para correlacionar as taxas de infecção encontradas com o escore clínico de cada cão, foi utilizado o teste de Spearman.

A taxa de positividade na MB e BC foi calculada dividindo o número de animais com resultado positivos pelo número de animais total avaliado.

O teste exato de Fisher foi utilizado para analisar as correlações: i) entre as positivities das MBs realizadas em diversos locais da pele de 44 cães no teste piloto, ii) entre o número de resultados positivos da qPCR de aspirado esplênico, BC e MBs realizadas nos 26 cães do teste piloto nos quais também foram coletadas amostras de baço e pele no estudo de coorte, iii) entre a classificação clínica e o resultado do xenodiagnóstico e MBs, iv) entre os cães positivos em algum dos xenodiagnósticos e alguma das MBs, bem como com aqueles cães positivos nas BCs, vi) e também entre os animais positivos em alguma das MBs, entre o resultado das MBs e o obtido com a BC.

Para avaliar a concordância entre os testes realizados foi utilizado o coeficiente Kappa de Cohen nas comparações: i) entre a positividade em ao menos uma das MBs ou do focinho e/ou orelhas com os resultados positivos do aspirado esplênico e BC, ii) entre o resultado do xenodiagnóstico e das MBs e BCs, iii) entre os resultados das MBs e BCs.

O Odds Ratio foi calculado para avaliar a chance de uma MB ou xenodiagnóstico ser positivo dado que, no local de realização dos mesmos, havia a presença de lesões características da LVC como úlceras, nódulos, despigmentação e hiperqueratose.

A fim de comparar a carga parasitária da MB com a carga da BC, a primeira foi corrigida, multiplicando-se por 6000, de acordo com o fato da amostra de pele coletada pela MB ser 6000 vezes menor em comparação ao punch de 3mm (LIN et al., 2013). Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar a correlação entre as cargas parasitárias das MBs e BCs. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as cargas parasitárias das MBs com resultado positivo dos cães sintomáticos e assintomáticos. A carga parasitária

obtidas nas MBs também foram correlacionadas com o escore clínico utilizando o teste de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE *L. LONGIPALPIS* DE CAMAÇARI

Foram capturados 2741 flebotomíneos em Camaçari/BA, nos dois meses de captura para iniciar a colônia. Dos flebotomíneos coletados e separados para identificação da espécie, a grande maioria foi identificada como sendo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, exceto aqueles capturados em uma residência no bairro de Machadinho, sendo este local de captura excluído nas coletas seguintes.

Os flebotomíneos das primeiras gerações que foram separados para a identificação, foram identificados como sendo da espécie *L. longipalpis*, resultado confirmado por especialistas do LACEN/BA. Dentre os 2741 insetos capturados, 822 eram fêmeas que foram expostas a hamsters Golden Syrius no insetário do IGM, para que realizassem o repasto sanguíneo. Em média, 80% das fêmeas selvagens se alimentaram do sangue do hamster. Na tabela 3, observam-se os dados das primeiras gerações da colônia e o crescimento no número de ovos e da razão do número de fêmeas emergidas em relação ao número de fêmeas alimentadas que puseram os ovos desta geração.

Tabela 3: Acompanhamento das primeiras gerações da colônia de *L. longipalpis* de Camaçari/BA.

Geração	Fêmeas alimentadas	Número de ovos	Fase larval (média em dias)	Adultos emergidos	Proporção fêmeas/machos	Fêmeas produzidas
F0	---	---	---	88	---	---
F1	389	10504	35	6981	1,04	6,71
F2	1537	33275	40	2728	0,87	8,39
F3*	527	10550	---	---	---	---

* - As contabilizações foram reduzidas a partir da terceira geração, permanecendo somente a contagem do número de fêmeas alimentadas colocadas em cada de oviposição.

No gráfico da figura 9A, está exposto o crescimento da colônia no seu primeiro ano de acordo com o número de fêmeas alimentadas por semana que foram colocadas para pôr ovos em potes plásticos com o assoalho de gesso. Neste período, os picos de produção ficaram cada vez maiores atingindo um número de 5683 fêmeas alimentadas em uma semana. A contagem de potes como forma de monitoramento do crescimento da colônia pode ser observada na figura 9B. Observa-se que o número de potes também cresceu ciclicamente, começando com 20 potes no início da contagem e tendo seu ápice com 122 potes.

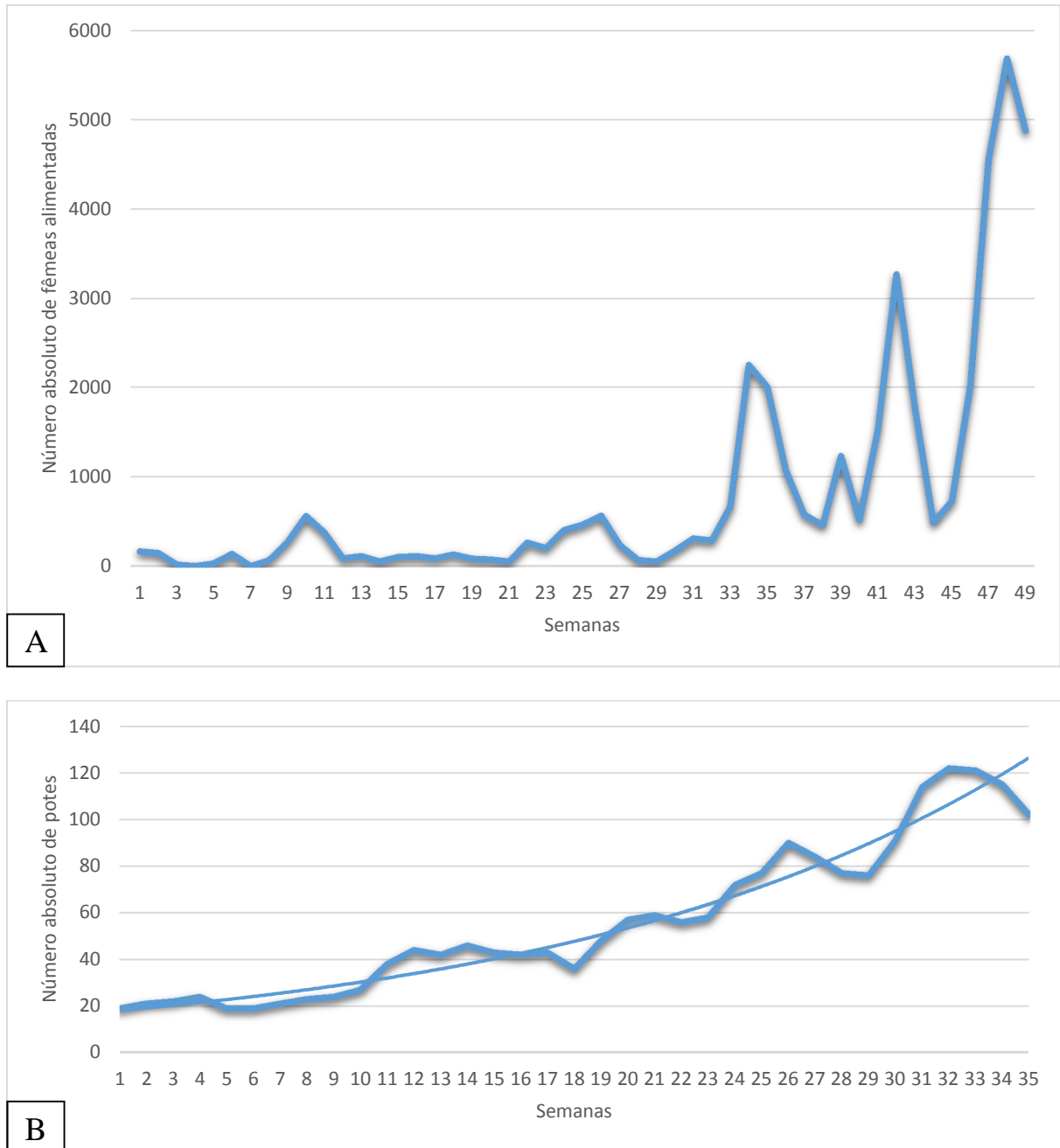


Figura 9: Monitoramento da colônia de *L. longipalpis* de Camaçari/BA no seu primeiro ano (entre maio de 2016 e abril de 2017), sendo contabilizados em na figura 9A o número de fêmeas alimentadas por semana e em 9B o número total de potes da colônia, semanalmente, entre setembro de 2016 e maio de 2017.

5.2 AVALIAÇÃO PILOTO DA MICROBIÓPSIA DE PELE

A fim de compreender o funcionamento da MB, 14 cães assintomáticos e 26 sintomáticos foram testados em diversos locais como o focinho, orelhas, região escapular esquerda, patas e áreas com alopecia. Destes animais, em 14 (35%) houve detecção do kDNA

em MBs, sendo três (21%) cães assintomáticos, com resultado positivo na MB realizada no focinho e 11 (79%) sintomáticos com pelo menos uma das MBs com resultado positivo. Então houve positividade na MB em três (21%) dos 14 cães assintomáticos avaliados e em 11 (42%) dos 26 sintomáticos avaliados. Houve diferença estatística na detecção do kDNA do parasito com MB entre os cães sintomáticos e assintomáticos. Na tabela 4, pode-se observar tanto o diagnóstico prévio utilizado para selecionar o animal quanto as positivities encontradas no estudo dos cães selecionados.

Tabela 4: Diagnóstico prévio e positividade encontrada nos 40 cães selecionados para o estudo piloto.

(continua)

	Animal	Escore	Diagnóstico prévio			Positividade no estudo piloto			
			DPP	ELISA	qPCR*	Cult. Es.	BC	AE	MB
26 Cães que também tiveram a qPCR da pele e aspirado esplênico (AE)	1	0 (A)	(+)	(+)	(+)				(+)
	2	0 (A)	(+)		(+)				
	3	1 (A)	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)	
	4	2 (A)	(+)					(+)	
	5	2 (A)	(+)					(+)	
	6	2 (A)	(+)	(+)					
	7	3 (A)	(+)	(+)		(+)			
	8	4 (S)		(+)		(+)		(+)	(+)
	9	4 (S)	(+)	(+)	(+)			(+)	(+)
	10	4 (S)	(+)	(+)		(+)		(+)	
	11	4 (S)		(+)			(+)		(+)
	12	5 (S)	(+)	(+)					
	13	5 (S)		(+)	(+)	(+)		(+)	(+)
	14	5 (S)	(+)				(+)	(+)	
	15	6 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	16	6 (S)	(+)	(+)	(+)				
	17	6 (S)	(+)	(+)	(+)				
	18	6 (S)	(+)	(+)					
	19	7 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	20	7 (S)	(+)	(+)				(+)	
	21	8 (S)	(+)	(+)				(+)	
	22	9 (S)		(+)	(+)				
	23	11 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	24	12 (S)		(+)				(+)	
	25	14 (S)	(+)		(+)			(+)	(+)
	26	15 (S)	(+)	(+)					(+)

(conclusão)

	Animal	Escore	Diagnóstico prévio			Positividade no estudo piloto			
			DPP	ELISA	qPCR*	Cult. Es.	BC	AE	MB
14 Cães que só tiveram a qPCR da MBs	27	0 (A)	(+)	(+)			nr.	nr.	
	28	1 (A)	(+)	(+)		(+)	nr.	nr.	
	29	1 (A)	(+)				nr.	nr.	
	30	1 (A)			(+)		nr.	nr.	
	31	1 (A)	(+)	(+)			nr.	nr.	(+)
	32	2 (A)	(+)	(+)	(+)		nr.	nr.	
	33	3 (A)	(+)		(+)		nr.	nr.	(+)
	34	4 (S)			(+)		nr.	nr.	
	35	4 (S)	(+)		(+)		nr.	nr.	
	36	5 (S)	(+)				nr.	nr.	
	37	5 (S)	(+)				nr.	nr.	
	38	5 (S)	(+)	(+)			nr.	nr.	
	39	8 (S)	(+)	(+)		(+)	nr.	nr.	(+)
	40	9 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	nr.	nr.	(+)

*Positividade na qPCR de sangue, pele e/ou aspirado esplênico

A – Assintomático

S - Sintomático

BC – Biópsia convencional

AE – Aspirado esplênico

MB – Microbiópsia de pele

nr. – Não realizado

Na tabela 5 observa-se a carga parasitária detectada em cada amostra de MB avaliada dos animais positivos. A carga parasitária variou entre 0,85 e 3566,5 *Leishmania*, sendo em média maior nos cães sintomáticos do que nos assintomáticos, 736,84 e 10,93 respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre as cargas parasitária das MBs com resultado positivo nos cães sintomáticos e assintomáticos.

Tabela 5: Microbiópsias de pele com resultados positivos, realizadas em diversos locais da pele, e suas cargas parasitárias detectadas por qPCR nos 14 cães que tiveram pelo menos uma MB com resultado positivo.

Cão	Escore clínico*	Carga parasitária detectada nas microbiópsias de pele**					
		Focinho	OE	OD	REE	Pata	Local com alopecia
1	0 (A)	5,11	0	0	nr.	nr.	nr.
31	1 (A)	1,26	2,55	0	nr.	nr.	nr.
33	3 (A)	34,82	0	0	nr.	nr.	nr.
8	4 (S)	2327,25	3,17	0	nr.	nr.	nr.
9	4 (S)	53,57	0	0,85	nr.	nr.	nr.
11	4 (S)	0	0	nr.	2,17	nr.	nr.
13	5 (S)	0,14	nr.	0	nr.	nr.	nr.
15	6 (S)	0,42	0,42	0,52	nr.	nr.	nr.
19	7 (S)	140,2	2724,3	243,0	nr.	2,4	nr.
39	8 (S)	3,15	3185,34	3175,74	nr.	nr.	nr.
40	9 (S)	85,49	0	0	nr.	nr.	nr.
23	11 (S)	3566,5	806,9	0	576,3	nr.	nr.
25	14 (S)	6,11	nr.	0	nr.	nr.	nr.
26	15 (S)	0	0	4,64	nr.	nr.	38,78
Positividade (no de positivos/no. total avaliado)		86%	50%	38%	***	***	***

A – Assintomático

S - Sintomático

OE – Orelha esquerda

OD – Orelha direita

REE – Região escapular esquerda

nr. – Não realizado

* $p < 0,05$ teste exato de Fisher

** $p > 0,05$ teste de correlação de Spearman

*** - A taxa de positividade não foi calculada devido ao baixo número de MBs realizadas nestes locais da pele

As MBs de 26 dos 44 cães testados neste piloto foram realizadas no mesmo momento de coleta de aspirado esplênico e BC do estudo de coorte do qual os cães foram selecionados. Assim, a sensibilidade de detecção da infecção por *Leishmania* na qPCR destas amostras biológicas foram comparadas com a obtida com as MBs como pode ser observado na figura 10. Comparando a positividade em pelo menos uma das MBs ou do focinho e/ou orelhas com os resultados positivos da qPCR do aspirado esplênico e BC, não houve diferença estatística

significativa (Teste de Fisher). O índice de concordância Kappa variou entre 0,096 entre os resultados da MB da orelha direita com o aspirado esplênico e 0,480 entre o resultado de pelo menos uma MB com resultado positivo com os resultados da qPCR do aspirado esplênico.

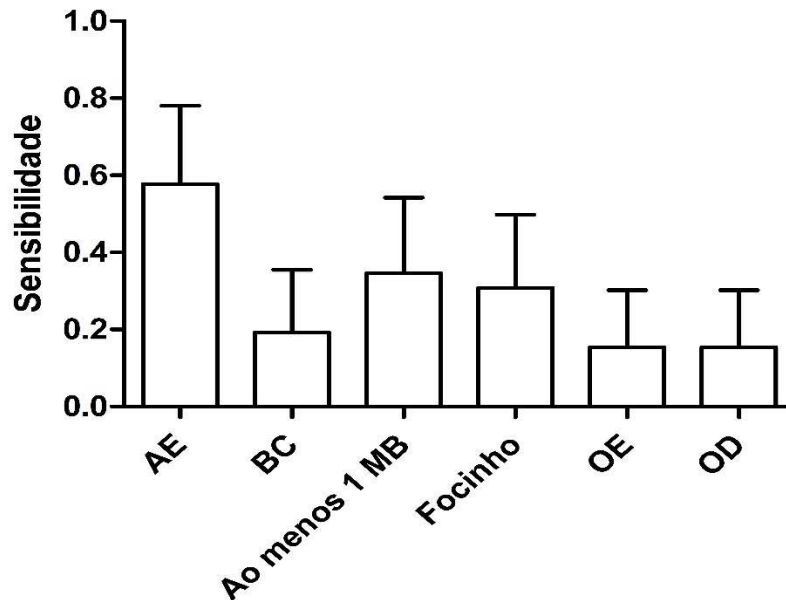


Figura 10: Histograma das sensibilidades das qPCRs de aspirado esplênico (AE), biópsia convencional de pele com punch de 3mm (BC) e microbiópsias de pele (MB), avaliando 26 cães quanto à detecção de infecção natural por *L. infantum*. As MBs foram realizadas no focinho e nas orelhas esquerda (OE) e direita (OD), sendo os outros locais, região escapular esquerda, pata e área com alopecia, retirados dessa análise devido à baixa amostragem nestes locais. A análise utilizando o teste exato de Fisher não mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS NO XENODIAGNÓSTICO X MICROBIÓPSIAS DE PELE

Tanto o xenodiagnóstico quanto a MB não detectaram a presença de *L. infantum* nos 45 locais de pele avaliados nos 15 cães assintomáticos avaliados. Nos 20 cães sintomáticos avaliados foi possível detectar transmissão do parasito para flebotomíneos em três animais (15%). Na tabela 6, observa-se tanto o diagnóstico prévio utilizado para selecionar o animal quanto as positivities encontradas no estudo dos cães selecionados.

Tabela 6: Descrição geral dos 35 cães selecionados para o estudo entre a MB, xenodiagnóstico e BC.

Animal	Escore	Diagnóstico prévio			Positividade no estudo			
		DPP	ELISA	qPCR*	Cult. Es.	BC	Xeno.	MB
1	0 (A)	(+)	(+)					
2	0 (A)	(+)		(+)				
3	1 (A)	(+)	(+)					
4	1 (A)	(+)	(+)					
5	1 (A)	(+)	(+)					
6	1 (A)			(+)				
7	1 (A)	(+)		(+)				
8	1 (A)	(+)			(+)			
9	2 (A)		(+)					
10	2 (A)		(+)	(+)				
11	2 (A)				(+)			
12	2 (A)	(+)	(+)		(+)			
13	3 (A)		(+)					
14	3 (A)		(+)	(+)				
15	3 (A)	(+)		(+)				
16	4 (S)	(+)	(+)		(+)			
17	4 (S)	(+)	(+)		(+)			
18	5 (S)		(+)					
19	5 (S)	(+)						
20	5 (S)	(+)	(+)		(+)			
21	5 (S)				(+)			
22	6 (S)		(+)					(+)
23	6 (S)	(+)	(+)					
24	6 (S)	(+)						
25	7 (S)		(+)					(+)
26	7 (S)	(+)	(+)		(+)			(+)
27	8 (S)	(+)	(+)					
28	9 (S)	(+)	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)
29	9 (S)	(+)	(+)		(+)			
30	11 (S)	(+)	(+)				(+)	(+)
31	12 (S)			(+)				
32	12 (S)				(+)			
33	12 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)
34	12 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)
35	15 (S)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

*Positividade na qPCR de sangue, pele e/ou aspirado esplênico

A – Assintomático

S - Sintomático

BC – Biópsia convencional

AE – Aspirado esplênico

MB – Microbiópsia de pele

nr. – Não realizado

Na tabela 7, pode-se observar as taxas de alimentação e infecção dos xenodiagnósticos nos três locais da pele avaliados nos cães sintomáticos. Não houve diferença significativa quando a classificação clínica foi correlacionada com a capacidade de transmissão pelo xenodiagnóstico (teste exato de Fisher). As taxas de infecção variaram entre 13% e 50% no último ponto de avaliação após o xenodiagnóstico e todos os flebótomos com resultado positivo apresentavam, visualmente, alta carga parasitária com presença de parasitos bem ativos na forma de promastigota metacíclica. Não houve diferença estatística significativa na correlação entre as taxas de infecção e o escore clínico (teste de correlação de Spearman).

As taxas de alimentação dos flebótomos nos xenodiagnósticos realizados variaram entre 4% e 96%, sendo em média maior na face interna da orelha esquerda, com 64%, seguido do abdômen (63%) e focinho (48%). Em todos os xenodiagnósticos, onde houve transmissão, independente do sítio da pele avaliado, houve uma taxa de alimentação igual ou superior a 48%. Um animal transmitiu o parasito somente no xenodiagnóstico realizado na face interna da orelha esquerda (82% de alimentação) e outro animal somente no focinho (48% de alimentação). O terceiro cão que teve algum xenodiagnóstico positivo transmitiu tanto pelo focinho quanto pelo abdômen (63 e 65% de alimentação). Este mesmo cão teve flebotomíneos infectados no xenodiagnóstico do abdômen tanto na avaliação por dissecação e microscopia óptica no 2º e 9º dia após o repasto sanguíneo.

Tabela 7: Taxas de alimentação dos xenodiagnósticos realizados no focinho, orelha esquerda e abdômen de 20 cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e suas taxas de infecção no segundo (entre o 2° e 3° dia) e terceiro (entre o 8° e 10° dia) pontos de avaliação após o repasto sanguíneo.

Cão	Escore Clínico	Taxa de alimentação* %				Taxa de infecção dos Xenodiagnósticos % (n)						Taxa de infecção global % (N)
						2° - 3° dia após**			8° - 10° dia após			
		Focinho	OE	Abdômen	Média	Focinho	OE	Abdômen	Focinho	OE	Abdômen	
16	4	31%	38%	46%	38%							0% (47)
17	4	55%	66%	71%	64%							0% (59)
18	5	20%	4%	46%	23%		○			○		0% (32)
19	5	58%	58%	45%	53%							0% (60)
20	5	54%	76%	54%	61%							0% (72)
21	5	65%	70%	69%	68%							0% (67)
22	6	25%	60%	51%	45%							0% (57)
23	6	28%	89%	48%	55%							0% (36)
24	6	33%	58%	87%	59%							0% (35)
25	7	73%	51%	68%	64%							0% (60)
26	7	59%	96%	86%	80%							0% (55)
27	8	65%	63%	79%	69%							0% (60)
28	9	65%	65%	63%	64%			20% (5)	40% (5)		18% (11)	14% (35)
29	9	61%	70%	81%	71%							0% (60)
30	11	48%	48%	58%	51%				13% (15)			3% (60)
31	12	79%	86%	50%	72%							0% (60)
32	12	72%	62%	87%	73%							0% (28)
33	12	21%	65%	54%	47%							0% (52)
34	12	26%	52%	45%	45%				□			0% (29)
35	15	53%	82%	65%	67%					50% (8)		11% (35)
Positividade◇						0%	0%	5%	10%	5%	5%	1% (999)

* - Taxa de alimentação foi calculada pelo número de flebotomíneos fêmea alimentados sobre o número de fêmeas utilizadas no xenodiagnóstico (entre 60 e 80).

** - Taxa de infecção foi determinada pelo número de intestinos com a presença de promastigotas de *L. infantum* sobre o número total de intestinos dissecados do mesmo ponto de avaliação.

◇ - Frequência relativa de cães sintomáticos positivos no xenodiagnóstico

n – Número de intestinos dissecados

N – Total de intestinos de flebotomíneos dissecados por animal

OE – Face interna da orelha esquerda

○ - Somente três fêmeas alimentadas em decorrência do cão ser agressivo e não permitir que o xenodiagnóstico fosse realizado por 30 minutos.

□ - Devido à baixa taxa de alimentação, não houve flebotomíneos dissecados

Em todos os três animais positivos no xenodiagnóstico, todos os locais de pele, onde houve transmissão da *L. infantum* ao vetor foram positivos nas MBs correspondentes (100% de concordância). Para avaliação da correlação entre a classificação clínica dos animais e a positividade na MB, os 20 cães sintomáticos foram subdivididos em 11 cães com quadro clínico moderado e 9 cães com quadro grave. Nos animais com doença moderada, somente a MB detectou animais positivos e todos os xenodiagnósticos foram negativos. Nos cães com doença grave, as duas técnicas detectaram a presença do parasito, como pode ser observado na tabela 8. Porém, a taxa de infectividade dos cães foi menor com o xenodiagnóstico (9%) em relação a detectada na MB (23%), tendo sido realizadas nos mesmos locais, o repasto sanguíneo dos flebotomíneos fêmeas e a MB. Esta diferença foi estatisticamente significativa com $p < 0,05$ na análise com o teste exato de Fisher e os dois testes apresentaram um índice de concordância Kappa de 0,481. Houve correlação entre a classificação clínica e a positividade na MB ($p < 0,05$).

Tabela 8: Percentual de cães que transmitiram *L. infantum* ao vetor *L. longipalpis* por meio do xenodiagnóstico e MBs com kDNA do parasito detectado por qPCR, realizados no mesmo local da pele de 35 cães naturalmente infectados com diferentes classificações clínica.

Classificação clínica (n)	Taxa de infecção % (n)					
	Xenodiagnóstico			MB		
	Focinho	OE	Abdômen	Focinho	OE	Abdômen
Assintomático (15)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Sintomático (20)	10% (2)	5% (1)	5% (1)	25% (5)	20% (4)	15% (3)
Moderado (11)	0%	0%	0%	0%	9% (1)	18% (2)
Grave (9)	22% (2)	11% (1)	11% (1)	56% (5)	33% (3)	11% (1)
Total (35)	6% (2)	3% (1)	3% (1)	14% (5)	11% (4)	9% (3)
Geral (35)*	9% (3)**			23% (8)		

n – Número de animais

OE – Face interna da orelha esquerda

MB – Microbiópsias de pele

* - Alguns cães foram positivos em mais de uma local da pele

** - Houve diferença estatística significativa entre as técnicas com $p < 0,05$, teste exato de Fisher e índice de concordância Kappa=0,481.

Dos xenodiagnósticos realizados nos 20 cães sintomáticos, foram dissecados entre 28 e 72 flebotômicos utilizados em cada animal, considerando os dois momentos de dissecação após o repasto sanguíneo. Assim, considerando o número total de intestinos dissecados nos três locais e nos dois momentos de dissecação, a infectividade dos três cães positivos foi de 3%, 11% e 14%. Deste mesmo grupo de animais sintomáticos, 999 intestinos de flebotomos foram dissecados e observados sob microscopia óptica, sendo encontrada a presença de *L. infantum* em 1% (12/999) deles. Na tabela 9, destaca-se a taxa de infecção de cada local de realização do xenodiagnóstico avaliado, calculada pela divisão do número de intestinos positivos pelo número de intestinos dissecados nos dois pontos de avaliação após o repasto sanguíneo. Nesta mesma tabela estão dispostas também as cargas parasitárias detectadas pelas MBs realizadas nos mesmos locais que variou entre 0,84 e 31598,88 parasitas. Não houve diferença estatística significativa entre a carga parasitária das MBs e o escore clínico (teste de correlação de Spearman).

Tabela 9: Taxas de infecção de cada cão no xenodiagnóstico e carga parasitária detectada nas MBs realizadas no focinho, orelha esquerda e abdômen de 20 cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

n – Número de intestinos de flebotomíneo dissecados

Cão	Escore clínico	Focinho		OE		Abdômen	
		Xeno % (n)	MB (CP)	Xeno % (n)	MB (CP)	Xeno % (n)	MB (CP)
16	4						
17	4						
18	5						
19	5						
20	5						
21	5						
22	6		393,88				
23	6						
24	6						
25	7				3,83		1,12
26	7						55,75
27	8						
28	9	20% (10)	7832,37		1526,87	19% (16)	0,84
29	9						
30	11	10% (20)	31589,88				
31	12						
32	12						
33	12		13431,80		66,65		
34	12		48,34				
35	15			31% (13)	11,71		
Positividade \diamond		10%	25%	5%	20%	5%	15%
Xeno - Xenodiagnóstico							

OE – Face interna da orelha esquerda

MB – Microbiópsias de pele

CP – Carga parasitária medida por qPCR

\diamond - Frequência relativa de cães sintomáticos positivos no xenodiagnóstico e MB

5.4 PRESENÇA LESÃO CUTÂNEA CARACTERÍSTICA DA LVC

Foi observada a presença de lesões cutâneas como úlcera, nódulos, despigmentação e hiperqueratose no focinho, características da LVC, nos sítios anatômicos onde foram realizados o xenodiagnóstico e microbiópsias. Dessa forma, a presença de tais lesões cutâneas aumentou em 4,64 vezes a chance de detecção do kDNA na MBs realizadas nos 35 cães que foram submetidos ao xenodiagnóstico e MB (teste exato de Fisher, $p=0,032$). Por outro lado, não houve associação entre a presença de lesões com a positividade no xenodiagnóstico ($p>0,05$, Fisher). Em relação as MBs do estudo piloto, a chance de uma MB ser positiva foi 6,04 vezes maior dado que no local havia a presença de lesão cutânea (teste exato de Fisher, $p=0,001$). Levando em consideração todos os cães do teste piloto e os que foram submetidos ao xenodiagnóstico, a chance de positividade na MB foi 5,24 vezes maior quando lesões estavam presente no local. Na tabela 10 é possível observar a positividade do xenodiagnóstico e MBs nos dois grupos de animais bem como a positividade quando havia a presença de lesões cutânea características da LVC.

Tabela 10: Positividades dos xenodiagnósticos e MBs considerando a presença de lesões cutânea características da LVC e suas respectivas Odds Ratios.

	Positividade	Positividade com lesão	Odds Ratio (IC 95%)
Xenodiagnóstico	3,81% (4/105)	2,86% (3/105)	6,18 (0,54-160,55)
MB	11,43% (12/105)	7,62% (8/105)	4,64 (1,14-20,26)*
MB – Piloto	15,83% (19/120)	11,67% (14/120)	6,04 (2,00-18,21)*
MB – Todos	13,78% (31/225)	9,78% (22/225)	5,46 (2,37-12,56)*

* $p<0,05$ (teste exato de Fisher)

5.5 MICROBIÓPSIA DE PELE COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO

Foram realizadas BC com punch de 3mm em 31 dos 35 cães testados quanto a capacidade de infecção pelas técnicas de xenodiagnóstico e de MB. Assim como foi observado em relação a positividade no xenodiagnóstico, somente cães com escore clínico maior que 9 tiveram positividade nas BCs que detectou o kDNA de parasito em 4 animais (13%). Entre o xenodiagnóstico e BC, houve diferença significativa (teste exato de Fisher, $p=0,036$) com índice de concordância Kappa de 0,518 (dados não mostrados).

Na tabela 11 as sensibilidades da MBs e BCs na detecção de infecção por *Leishmania* nos cães avaliados estão destacadas de acordo com a classificação clínica e local de realização da MB. O resultado mostra que independentemente do local de realização da MB, a sensibilidade se mostrou próxima da obtida com BC. Porém, quando a positividade do animal

utilizando MB foi determinada pela presença de resultado positivo em pelo menos uma das três MB realizadas, três cães a mais foram detectados com a presença do parasita na pele pela MB. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. O índice de correlação Kappa entre a positividade do cão na BC e em pelo menos uma MB foi de 0,674.

Tabela 11: Comparação entre as sensibilidades das BCs e MBs realizadas em três locais diferentes da pele de 31 cães avaliados quanto à capacidade de transmitir *L. infantum* ao vetor *L. longipalpis* utilizando a qPCR. Os animais sintomáticos foram estratificados de acordo com a apresentação clínica da doença.

Classificação clínica (n)	Sensibilidade % (n)				
	MBs nos diferentes locais da pele (n)			Positivo em pelo menos uma MB	BC
	Focinho	OE	Abdômen		
Assintomático (13)	0%	0%	0%	0%	0%
Sintomático (18)	28% (5)	22% (4)	17% (3)	39% (7)	22% (4)
Moderado (9)	0%	11% (1)	22% (2)	22% (2)	0%
Grave (9)	56% (5)	33% (3)	11% (1)	56% (5)	44% (4)
Positividade geral (31)	16% (5)	13% (4)	10% (3)	23% (7)	13% (4)

n – Número de animais

OE – Face interna da orelha esquerda

MB – Microbiópsias de pele

BC – Biópsia convencional de pele utilizando o punch de 3mm

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos

Kappa=0,674

A carga parasitária encontrada nas MBs foi corrigida, multiplicando-se o valor encontrado por 6000, dado que o tamanho da amostra de pele coletado pela MB é 6000 vezes menor em comparação com o punch de 3mm (LIN et al., 2013). Após essa correção, esta foi comparada com a carga parasitária encontrada nas BCs. Dessa forma, observa-se na figura 11 a distribuição das cargas parasitárias e suas medianas encontradas nas BCs e MBs realizadas em todos os cães do estudo piloto e do estudo de avaliação entre o xenodiagnóstico e MB, totalizando 55 animais avaliados. Utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatística significativa entre a quantidade de parasitas coletada pelos dois métodos de biópsia.

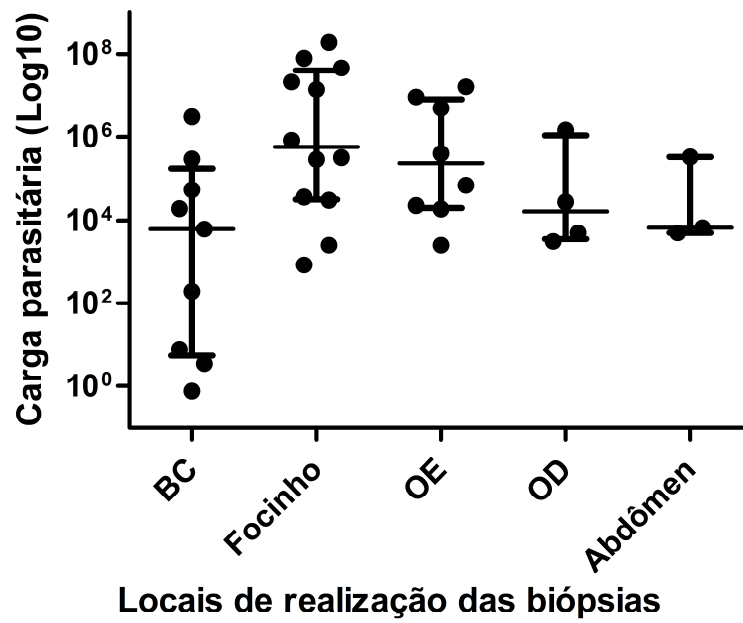


Figura 11: Comparação entre as medianas das cargas parasitárias encontradas nas BCs e MBs realizadas no focinho, orelha esquerda (OE), orelha direita (OD) e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Em síntese, o presente estudo visou avaliar a eficácia da MB na determinação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e também na sua utilização para o diagnóstico da doença comparando sua eficácia com a da qPCR de BC. Desta forma, cães previamente diagnosticados por sorologia e/ou cultura esplênica e/ou qPCR de aspirado esplênico, baço e sangue foram selecionados e foram realizados nestes animais BC, MB em diferentes locais e xenodiagnóstico.

Neste estudo somente cães sintomáticos com escore clínico acima de 9 apresentaram flebotomíneos infectados no xenodiagnóstico. Apesar de, não ter sido encontrada diferença estatística significativa na correlação entre a classificação clínica e a capacidade de transmissão, podemos afirmar que não houve detecção de transmissibilidade nos cães assintomáticos detectada pelo xenodiagnóstico. A despeito de não ter sido encontrada diferença estatística, ficou clara a distinção de transmissibilidade entre sintomáticos e assintomáticos, resultado que não discorda de trabalhos descritos na literatura, onde os cães em estágio mais avançado da doença foram mais infectivos ao inseto vetor pela técnica de xenodiagnóstico (MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008). No entanto, há divergências com os resultados obtidos em outros trabalhos, onde os cães em estágio mais avançado da doença foram mais infectivos ao inseto vetor pela técnica de xenodiagnóstico (COSTA-VAL et al., 2007; MICHALSKY et al., 2007; SOARES et al., 2011). Em contrapartida, em um estudo realizado por Laurenti e colaboradores (2013), os cães assintomáticos foram mais infectivos, divergindo da maioria dos trabalhos da literatura. Esses resultados diferentes podem ter sido encontrados devido a diferentes formas de classificação clínica empregadas nos estudos bem como com variações na metodologia do xenodiagnóstico como o número de flebotomíneos utilizados, local da pele onde foi realizado e forma de detecção da infecção no inseto (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

A taxa de alimentação dos flebótomos utilizados nos xenodiagnósticos variou entre 4% e 96%, sendo esta variação também descrita em outros trabalhos da literatura (MOLINA et al., 1994; GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2001; BORJA et al., 2016). A variação pode estar associada com fatores como a umidade, temperatura e ruídos no local onde o xenodiagnóstico foi realizado, bem como com características do próprio cão onde foi realizado o xenodiagnóstico, como o cheiro e presença de lesões características da LVC. A quantidade de fêmeas alimentadas interfere na sensibilidade do xenodiagnóstico, dado que maiores são as

chances de transmissão quanto maior for o número de fêmeas alimentadas (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Neste estudo observamos que todos os cães que transmitiram *L. infantum* ao vetor tiveram taxas superiores a 48% de alimentação nos respectivos sítios da pele onde foi detectada a infecção. Este achado pode apontar que pode haver uma taxa mínima de alimentação no xenodiagnóstico para que se consiga detectar positividade. Mas esse é um achado muito preliminar e que precisa ser melhor avaliado, pois em alguns xenodiagnósticos com taxas de alimentação superiores a 60% não foram encontrados parasitas nos intestinos dissecados.

Em relação ao melhor local para realização do xenodiagnóstico, na literatura, diversos trabalhos utilizam a face interna da orelha do cão como sítio anatômico para a realização da técnica (MICHALSKY et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; VERÇOSA et al., 2008; LAURENTI et al., 2013). No presente estudo, somente um animal foi capaz de transmitir *L. infantum* no xenodiagnóstico realizado na orelha. Os outros dois cães com positividade no xenodiagnóstico foram positivos nos exames realizados no focinho e no abdômen e se somente houvesse sido realizado o xenodiagnóstico na orelha estes teriam sido considerados como animais não infectivos. Sabe-se que a parasitemia cutânea da *L. infantum* não se distribui de forma homogênea por toda a pele do animal (VERÇOSA et al., 2008; ASLAN et al., 2016). Dessa forma o local da pele onde o xenodiagnóstico é realizado se torna bastante importante no que tange a sensibilidade da técnica. De acordo com Doehl e colaboradores (2017), a distribuição heterogênea do parasito na pele do animal promove a formação de focos onde a carga parasitária é maior e locais com baixa carga. Assim, eles ressaltam a importância da realização do xenodiagnóstico e de biópsias cutâneas em diversos locais da pele do animal para avaliar de forma mais sensível a capacidade de transmissão e a parasitemia cutânea. Nossos resultados reforçam esta afirmação.

Na literatura, sugere-se que a carga parasitária cutânea no local da picada é importante para que haja a transmissão do parasita ao vetor (COURTENAY et al., 2014). Dentre os xenodiagnósticos positivos no presente trabalho, houve variação grande nas cargas parasitárias detectadas, com a detecção variando entre 11,71 e 31589,88 parasitos, por meio da MB realizada no mesmo local do xenodiagnóstico. Em um focinho com mais de 13000 parasitas detectados e outro com quase 400 parasitas não houve detecção de flebotomíneos infectados no xenodiagnóstico realizado nos mesmos locais nos mesmos animais. Logo, a presença de parasitos na pele do cão infectado pode ser ainda mais focal do que o que é descrito na literatura, sendo possível que a MB tenha coletado uma alta quantidade de parasitos enquanto que na

mesma área de 3,14 cm² nenhum flebotomíneo tenha se infectado (DOEHL et al., 2017). Entretanto, com os resultados obtidos no presente estudo, tal afirmação não pode ser confirmada, dado que nestes locais de alta carga parasitária e xenodiagnóstico negativo, a taxa de alimentação foi inferior a 30%, fato que pode ter comprometido a sensibilidade do xenodiagnóstico.

No presente estudo a identificação de formas promastigotas no intestino do flebótomo após o xenodiagnóstico foi realizada apenas por visualização direta em microscópio óptico após a exposição do intestino do flebótomo. Sabe-se que esta forma de detecção da infecção no flebotomíneo possui baixa sensibilidade, especialmente quando realizada antes da defecação do sangue, uma vez que as células sanguíneas dificultam a visualização do parasita (MYSKOVA; VOTYPKA; VOLF, 2008). Uma forma de melhorar a sensibilidade e diminuir os falsos negativos nestes casos seria a realização de técnicas moleculares para detectar o kDNA da *L. infantum* após a visualização do intestino no microscópio óptico (SOARES et al., 2011). Os intestinos dissecados no presente estudo foram armazenados e tiveram seu material genético extraído. No entanto, a qPCR dos mesmos ainda não foi realizada devido a problemas com a padronização desta técnica molecular. Assim, é possível que o número de cães do presente trabalho que transmitiram o parasito ao flebótomo seja superior ao observado até o momento.

Outra forma de melhorar a taxa de detecção foi avaliar uma parte dos flebótomos utilizados no xenodiagnóstico em momentos diferentes após o repasto sanguíneo, no segundo ou terceiro dia e entre o oitavo e decimo dia. Também decidimos utilizar dois pontos, pois a avaliação de infecções em pontos mais tardios é crucial para avaliar a capacidade vetorial que o flebotomíneo infectado no xenodiagnóstico teria de infectar outros hospedeiros (KAMHAWI, 2006). Porém observamos que a mortalidade pode ser uma complicação ao se avaliar momentos mais tardios da infecção no flebotomíneo, dado que as chances de detecção aumentam com a maior quantidade de intestinos investigados (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). Dentre os quatro xenodiagnósticos positivos, as taxas de infecção variaram entre 13% e 40%. Entretanto, dentre os xenodiagnósticos positivos, o número de intestinos avaliados variou entre cinco e 15 devido a diferenças nas taxas de alimentação e sobrevivência. Após sete ou oito dias da realização do repasto sanguíneo a sensibilidade do xenodiagnóstico é maior, uma vez que caso a infecção no intestino se mantenha a quantidade de parasitos é maior (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Além disso, é possível observar a proporção de promastigotas metacíclicas, indicando uma infecção mais madura, que está associada com o sucesso da transmissão de *Leishmania* juntamente com a alta carga parasitária (ASLAN et al., 2013). No

presente estudo, 31% (33/105) dos xenodiagnósticos tiveram poucos sobreviventes, menos que 10 insetos, na avaliação entre o 8º e 10º dia após o repasto sanguíneo. Isto pode ter ocorrido devido a variações na umidade dos potes onde os flebotomíneos foram mantidos. Apesar da alta mortalidade observada, a quantidade de flebotomíneos avaliados em cada xenodiagnóstico foi superior a 15, considerando os três pontos de avaliação utilizados no presente estudo nos casos de maior mortalidade. Quando todos os três locais de realização do xenodiagnóstico foram considerados em conjunto na avaliação da capacidade de transmissão do cão, ao menos 40 flebotomíneos foram analisados em cada animal. A utilização do ponto tardio de avaliação, 8-10 dias após o repasto sanguíneo, se mostrou muito importante na avaliação da positividade, pois neste ponto foram detectados três animais positivos, e se a avaliação ocorresse somente no segundo dia após o xenodiagnóstico somente um animal teria resultado positivo.

O presente trabalho é o primeiro estudo que utiliza a MB no contexto da LVC avaliando a sua utilização como alternativa para o xenodiagnóstico na determinação da capacidade de transmissão de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e como alternativa de diagnóstico da LVC frente à BC. A MB foi desenvolvida recentemente para o diagnóstico de melanomas e outras doenças de pele, em busca de um método de coleta de amostra cutânea que não fosse invasiva e não causasse cicatrizes como as biópsias comumente empregadas na prática clínica (LIN et al., 2013). Até o momento, somente cinco trabalhos estão disponíveis na literatura que utilizaram tal método de coleta de amostra de pele para o diagnóstico de melanoma e detecção do DNA do papilomavirus humano (PROW; LIN; SOYER, 2013; TOM et al., 2016; TAN et al., 2015). Devido a sua característica de ser uma técnica minimamente invasiva e rápida, Kirstein e colaboradores (2017) utilizaram com sucesso a MB para o diagnóstico da LV em humanos na Etiópia.

Assim como na picada de flebotomíneos, a MB também coleta células cutâneas e sanguíneas. Dessa forma, um dos objetivos do presente trabalho foi de avaliar a eficácia da MB e compará-la em relação ao xenodiagnóstico como alternativa na determinação da capacidade de transmissão de cães infectados por *L. infantum* ao flebotomíneo *L. longipalpis*. Em torno de 90% dos resultados, positivos e negativos, destas duas técnicas foram concordantes, com acurácia de 92% e um índice de concordância Kappa de 0,481, considerado como moderado. Entretanto, a qPCR das MBs realizadas nos mesmos locais onde os flebotomíneos realizaram o repasto sanguíneo detectou um maior número de cães como positivo. Esse resultado mostra que a MB é mais sensível que o xenodiagnóstico, pois detectou positividade nos cães com resultado positivo no xenodiagnóstico, mas detectou *Leishmania* em outros cães em que o

xenodiagnóstico foi negativo. Nesta correlação houve diferença estatística significativa, $p < 0,05$ teste de Fisher.

Ainda que a MB indique a capacidade de transmissão de cães infectados por *L. infantum*, somente a detecção do kDNA do parasito, não permite observar características importantes como a motilidade, estágio de desenvolvimento ou a proporção de promastigotas metacíclicas. Tais características são importantes na determinação da capacidade vetorial que o flebotomíneo infectado teria de transmitir a outro hospedeiro (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007). Somente por meio do xenodiagnóstico seguido de dissecação e observação sob microscopia óptica na avaliação da infecção do intestino médio do inseto é possível observar tais características supracitadas (ASLAN et al., 2013). Embora a MB tenha detectado um maior número de cães, todos os locais que foram positivos no xenodiagnóstico também foram positivos na MB, devido a sua alta acurácia e concordância com o xenodiagnóstico, 92% e 90% respectivamente. Mostrando que deve ser melhor avaliada quanto a utilização para avaliação de transmissibilidade.

Diversos trabalhos na literatura sugerem que a carga parasitária na pele está associada com a transmissibilidade do cão (VERÇOSA et al., 2008; ASLAN et al., 2016; BORJA et al., 2016;). À vista disso, a MB pode ser utilizada como forma de triagem na detecção de cães que potencialmente estão transmitindo o parasita ao vetor. A MB também pode ser uma ferramenta de grande importância na identificação dos locais da pele do cão infectado onde há maiores chances de transmissão. No presente estudo nenhum animal demonstrou sentir dor na realização da MB, evidenciando que esta técnica é minimamente invasiva e indolor podendo ser realizada em qualquer local da pele do animal. Dessa forma a MB contribui na detecção dos locais da pele onde o xenodiagnóstico terá maior sensibilidade.

Devido à complexidade do diagnóstico da LVC, principalmente em relação ao grupo de cães com infecção subclínica, faz-se necessário a busca por testes mais sensíveis e menos invasivos (NOGUEIRA et al., 2018). Neste contexto, órgãos como o baço, medula óssea e linfonodos apresentam maior sensibilidade que outros tecidos como sangue, em especial quando técnicas moleculares para detectar o kDNA do parasito são empregadas (TRAVI et al., 2018). Porém, a coleta dessas amostras biológicas é invasiva e necessita de local apropriado e profissional treinado para não causar hemorragias, dor ou lesões no animal (BARROUIN-MELO et al., 2006; MAIA et al., 2009).

A pele é um tecido que apresenta alta carga parasitária, sendo considerado juntamente com baço como um dos tecidos com maior quantidade de parasitas durante o curso da infecção por *Leishmania* (ABRANCHES et al., 1991; REIS et al., 2006; DANTAS-TORRES, 2007). Além disso a coleta de amostras de pele é menos invasiva quando comparada com outros tecidos supracitados como o baço (VERÇOSA et al., 2008). A sensibilidade de testes moleculares que utilizam a pele para detectar a presença da *L. infantum* é bastante discutida na literatura. Alguns trabalhos mostram que a qPCR deste tecido possui sensibilidade similar a qPCR de aspirado esplênico ou medula óssea (ALMEIDA et al., 2013; REIS et al., 2013). Em contrapartida, outros autores mostram uma baixa sensibilidade no diagnóstico da LVC quando a detecção do DNA do parasito é realizada com amostras de pele em comparação com outros tecidos como o baço (LIMA et al., 2010; SOLCÀ et al., 2014). Essa divergência de resultados pode estar associada com a heterogeneidade da parasitemia no tecido cutâneo que o cão infectado apresenta em decorrência do estágio clínico e/ou resposta imunológica que o animal desenvolve (ASLAN et al., 2016).

Frequentemente, a coleta de amostra de pele é realizada com o auxílio de punches de 3mm, fornecendo material suficiente para análises tanto histopatológicas quanto moleculares (BANAN et al., 2013). Apesar de ser pouco invasiva, esta técnica necessita de anestesia local, de assepsia e cuidados da ferida após a coleta, a fim de se evitar infecções bacterianas. Além disso, a realização da BC não é indicada em locais muito vascularizados como as orelhas e o focinho, uma vez que pode causar hemorragias e lesões severas (ALMEIDA et al., 2013). Desta forma, a MB se mostra como uma excelente e promissora alternativa, pois é ainda menos invasiva que a BC, é indolor, sendo desnecessária a utilização de anestésicos, o tamanho da amostra é 6000 vezes menor, sendo o tecido rapidamente reparado, e não necessita de cuidados após o procedimento de coleta (LIN et al., 2013). Entretanto, o seu tamanho reduzido não permite a realização de exames histopatológicos, sendo o seu uso restrito a técnicas moleculares. Frente aos pontos positivos da MB em relação à BC, estas duas formas de coleta de amostras de pele foram comparadas no presente estudo.

Inicialmente, no teste piloto foi observado que o focinho e as orelhas apresentavam maior positividade em relação aos outros locais testados, como patas, áreas de alopecia e região escapular esquerda. Embora nestes outros locais um menor número de cães tenha sido testado e tenha ocorrido menor positividade, fica evidente que nestes sítios da pele também é possível detectar a presença do parasita. Também é possível destacar a heterogeneidade da parasitemia no tecido cutâneo, uma vez que em um mesmo cão a MB foi positiva em alguns locais e outros

não. Tanto no teste piloto quanto no outro experimento realizados nos 35 cães que foram submetidos a MB e xenodiagnóstico, houve diferença estatística na detecção do kDNA do parasito com MB entre os cães sintomáticos e assintomáticos. Esses resultados corroboram dados da literatura onde o grupo de cães sintomáticos apresenta maior positividade nos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares empregados (SOLCÀ et al., 2014; FRAGA et al., 2016). Todos os três cães assintomáticos positivos no teste piloto foram positivos na MB realizada no focinho, sendo um animal também positivo na orelha esquerda. Além disso, o focinho também foi o sitio anatômico com maior positividade, 5 dos 8 (62,5%) cães positivos em alguma MB, dentre os animais submetidos ao xenodiagnóstico e MB. É descrito na literatura que o focinho é um local de preferência para o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo e um local onde frequentemente são encontradas lesões de pele (KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). De acordo com Aslan e colaboradores, focos de parasitas se desenvolvem no local onde foram inoculados pela picada de flebotomíneos infectados e servem posteriormente como fonte de infecção para outros flebótomos. Dessa forma, os resultados positivos do teste piloto com MB em três cães assintomáticos sugerem que nos animais com essa classificação clínica o focinho apresenta maior sensibilidade para a detecção do kDNA da *L. infantum*.

Nos animais do presente estudo foi observada uma associação entre a presença de lesões características da LVC como úlcera, nódulos e despigmentação com a positividade nas MBs, mas não houve associação com resultados do xenodiagnóstico. Este resultado com o xenodiagnóstico difere do que foi proposto por Aslan e colaboradores (2016), que encontrou associação entre a presença de lesões e a positividade no xenodiagnóstico. Em relação a MB, a chance de uma MB ser positiva foi mais de cinco vezes maior quando havia a presença de lesões no local, evidenciando que os sítios anatômicos com tais características aumentam a sensibilidade do diagnóstico que utilizam a pele como amostra biológica. Além disso, as lesões cutâneas observadas no presente estudo se encontravam na região da cabeça, focinho e orelhas, corroborando achados da literatura que apontam esta região como sendo local de predileção para picadas de flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1999). Esta preferência, por sua vez, pode estar associada com a formação de focos do parasita no local da picada que posteriormente geram tais lesões (VERÇOSA et al., 2008; ASLAN et al., 2016).

No presente estudo, a sensibilidade da MB se mostrou semelhante à do aspirado esplênico e BC em 26 cães no teste piloto ($p > 0,05$ Fisher), sendo que foram identificados cinco animais positivos na MB que não foram detectados pela BC. Posteriormente, o mesmo resultado

foi observado quando a MB foi comparada com a BC nos 31 cães incluídos no teste de correlação entre o xenodiagnóstico e MB. A carga parasitária obtida pela MB também se mostrou semelhante à encontrada pela BC, quando foi feita uma correção devido a diferença de tamanho de tecido que as duas apresentam. Desta forma, a MB se mostra como uma boa alternativa para o diagnóstico da LVC utilizando a pele como amostra biológica, em especial quando realizada em diversos sítios anatômicos do cão.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que a microbiópsia de pele pode ser usada como uma ferramenta na detecção dos cães e locais da pele dos mesmos que são potenciais fontes de infecção para flebotomíneos. Dessa forma, o local de realização do xenodiagnóstico pode ser escolhido de acordo com os locais da pele do cão infectado por *L. infantum* onde a sensibilidade será maior. Adicionalmente, a microbiópsia de pele pode ser utilizada como um substituto minimamente invasivo para a coleta de amostras de pele frente a biópsia de pele convencional que utiliza o punch de 3mm, auxiliando no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e na localização de focos de parasitas na pele.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691–703, 2014.
- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 6, p. 537–550, 1991.
- AL-SALEM, W.; HERRICKS, J. R.; HOTEZ, P. J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.
- ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 3, p. 321–324, 2013.
- ALTET, L. et al. Mapping and Sequencing of the Canine. **Society**, v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVARENGA, D. G. De et al. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194–197, 2010.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145–146, 1996. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol2no2/arias.htm>>.
- ASLAN, H. et al. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1328–1338, 2013.
- ASLAN, H. et al. New insights into the transmissibility of leishmania infantum from dogs to sand flies: Experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 11, p. 1752–1761, 2016.
- ATAYDE, V. D. et al. Exosome secretion by the parasitic protozoan Leishmania within the sand fly midgut. v. 13, n. 5, p. 957–967, 2015.
- BANAN, P. et al. Effects of ex vivo skin microbiopsy on histopathologic diagnosis in melanocytic skin lesions. **JAMA Dermatology**, v. 149, n. 9, p. 1107–1109, 2013.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BARBOZA, D. C. P. M. et al. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Prod.**, v. 7, n. 2, p. 152–163, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331–339, 2006.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195–197, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BATES, P. A. et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 131, 2015.

BEZERRA-VASCONCELOS, D. R. et al. 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, n. 3, p. 234–239, 2011.

BOCKENSTEDT, L. K.; RADOLF, J. D. Xenodiagnosis for posttreatment Lyme disease syndrome: Resolving the conundrum or adding to it? **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 7, p. 946–948, 2014.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect ... **Veterinary Parasitology**, v. 229, n. October, p. 110–117, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1a. ed. Brasília, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 1a. ed. Brasília, 2014b.

BRASIL. **Situação Epidemiológica da leishmaniose visceral no Estado da Bahia. Secretaria de Vigilância em Saúde**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2015-Boletim-de-Leishmaniose-Visceral-n.-01.pdf>>.

CAMPOS, R. et al. Trypanosoma cruzi detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 324–326, 2007.

CESSE, E. Â. P. et al. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. **Revista Brasileira de Saúde Maternal Infantil**, Recife, v. 1, n. 2, p. 167–176, 2001.

CHOWDHURY, R. et al. How Far are we from visceral leishmaniasis elimination in bangladesh? an assessment of epidemiological surveillance data. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

COSTA-VAL, A. P. da. et al. Canine visceral leishmaniasis : Relationships between clinical status , humoral immune response , haematology and. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 411–417, 2013.

- COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 26, 2014.
- COURTENAY, O. et al. 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. 1314–1320, 2002.
- CUNHA, S. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 155–158, 1995.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2009.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155–159, 2011.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531–538, 2012.
- DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2012.
- DE ASSIS, T. S. M. et al. The direct costs of treating human visceral Leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 478–482, 2017.
- DE SOUSA GONÇALVES, R. et al. Association between *Leishmania infantum* DNA in the hair of dogs and their infectiousness to *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 232, p. 43–47, 2016.
- DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, 2018.
- DOEHL, J. S. P. et al. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2017.
- DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.
- DUJARDIN, J. C. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1013–1018, 2008.
- EVANS, T. et al. American visceral leishmaniasis (kala-azar). **The Western Journal of Medicine**, v. 142, n. 6, p. 777–81, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4024631>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1306178>>.

- FITZPATRICK, A. et al. Sustaining visceral leishmaniasis elimination in Bangladesh – Could a policy brief help ? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–11, 2017.
- FRAGA, D. B. M. et al. The Rapid Test Based on Leishmania infantum Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 1–11, 2016.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.
- FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–11, 2012.
- GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.
- GONÇALVES, M. B. **Prevalência, distribuição e risco para leishmaniose visceral risco para leishmaniose visceral canina**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador, BA, Brasil, 2014.
- GUARGA, J. L. et al. Experimental infection of Phlebotomus perniciosus and determination of the natural infection rates of Leishmania infantum in dogs. **Acta Tropica**, v. 77, n. 2, p. 203–207, 2000.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- JULIÃO, F. S. et al. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319–324, 2007.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: **Canine Leishmaniasis: An Update : Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona**. 1. ed. Boxmeer: Intervet Int, 1999. p. 26–31.
- KIRSTEIN, O. D. et al. Minimally invasive microbiopsies: a novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of Leishmania donovani. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 10–11, p. 609–616, 2017.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.
- LAURENTI, M. D. et al. 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.

- LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–26, 2017.
- LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.
- LIMA, L. V. R. et al. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: Comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 5, p. 259–265, 2010.
- LIN, L. L. et al. Microbiopsy engineered for minimally invasive and suture-free sub-millimetre skin sampling. **F1000Research**, v. 2, p. 1–15, 2013.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120–126, 2016.
- MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142–144, 2009.
- MAIA, C. et al. Experimental transmission of leishmania infantum by two major vectors: A comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1–6, 2011.
- MANSUETO, P. et al. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 617–627, 2014.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.
- MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 357–360, 2007.
- MELCHIONDA, F. et al. Spleen nodules: A potential hallmark of Visceral Leishmaniasis in young children. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–5, 2014.
- MICHALSKY, É. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1–2, p. 67–76, 2007.
- MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 52, 2011.
- MODI, B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 5, p. 568–569, 1983.
- MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally *Phlebotomus perniciosus* infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491–493, 1994.
- MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. sup1, p. 29–45, 2003.

- MYSKOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. Leishmania in Sand Flies: 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.
- NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 67, 2012.
- NOGUEIRA, C. T. et al. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 197–201, 2018.
- OMS. **Kala-azar elimination programme: Report of a WHO consultation of partners.** Geneva, Switzerland 10–11 February 2015. World Health organization Geneva. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/185042/1/9789241509497_eng.pdf>.
- OMS. WHO. Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. **World Health Organization**, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017.
- PEIXOTO, H. M. et al. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil : systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015.
- PETERS, N. C. et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- PRADO, P. F. do. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561–566, 2011.
- PRATES, D. B. et al. Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.
- PROW, T. W.; LIN, L. L.; SOYER, H. P. The opportunity for microbiopsies for skin cancer. **Future Oncology**, v. 9, n. 9, p. 1241–1243, 2013.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.
- RAMPAZZO, R. de C. P. et al. A ready-to-use duplex qPCR to detect Leishmania infantum DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 100–107, 2017.
- REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.
- REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.
- REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural Leishmania infantum infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 2013.

- RIBEIRO, R. R. et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–2572, 2008.
- ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–13, 2012.
- ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.
- SINGH, O. P. et al. Elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. e304–e309, 2016.
- SOARES, M. R. A. et al. 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. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7–12, 2004.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1–2, p. 37–45, 2000.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.
- SOLCÀ, M. D. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.
- SOLCÀ, M. da S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 133–140, 2012.
- SOUSA, O. M. F. de. **Estudo da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* e a flutuação mensal de flebotômíneos coletados no município de Camaçari, Estado da Bahia**. 2013. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador, BA, Brasil, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7997>>.
- STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490–496, 2013.
- SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis in Somalia: A review of epidemiology and access to care. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2017.
- TAN, J. M. et al. BRAF wild-type melanoma in situ arising in a BRAF V600E mutant dysplastic nevus. **JAMA Dermatology**, v. 151, n. 4, p. 417–421, 2015.

- TEIXEIRA, C. et al. Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted leishmania major by exposure to uninfected bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 2–11, 2014.
- TOM, L. N. et al. Skin microbiopsy for HPV DNA detection in cutaneous warts. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 12, p. e215–e216, 2016.
- TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of Leishmania Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2013.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in colombia: Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3–4, p. 119–124, 2001.
- TRENCH, F. J. P. et al. First Report of Auto Chthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Annals of Clinical Cytology and Pathology**, v. 2, n. 6, p. 2–5, 2016.
- TURCHETTI, A. P. et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 4, p. 403–407, 2014.
- VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.
- VERAS, P. S. T. et al. New advances in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. In: CLABORN, D. M. (Ed.). **Leishmaniasis - trends in epidemiology, diagnosis and treatment**. [s.l.] InTech, 2014. p. 239–273.
- VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1–7, 2008.
- VERGEL, C. et al. Evidence for Leishmania (Viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 3, p. 503–511, 2006.
- VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, p. S1–S9, 2011.
- WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.