

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB**

Jussara Damascena de Oliveira

**ANÁLISE DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

**Picos – PI
2017**

Jussara Damascena de Oliveira

**ANÁLISE DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco

**Picos - PI
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

O482a Oliveira, Jussara Damascena de
Análise de métodos de diagnóstico para a leishmaniose visceral
canina / Jussara Damascena de Oliveira.– 2017.
CD-ROM : il. ; 4 ¾ pol. (48 f.)
Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em
Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.
Orientador(A): Profa. Dra. Ana Carolina Landim
Pacheco
1. Diagnóstico-Leishmaniose Visceral Canina. 2. TR DPP
® PCR. I. Título.

CDD 616.936.4

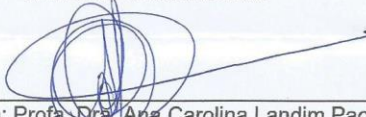
Jussara Damascena de Oliveira

**ANÁLISE DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

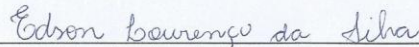
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 07/12/2017

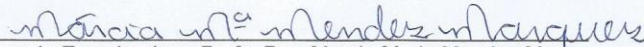
BANCA EXAMINADORA



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



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



Segunda Examinadora: Profa. Dra. Marcia Maria Mendes Marques
Curso de Ciências Biológicas - UFPI/CSHNB

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

**Picos - PI
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por sempre ter me guiado e protegido, pela família maravilhosa que escolheu para mim, que sempre será um símbolo de união e cooperação;

Aos meus pais Goretti Maria Damascena de Oliveira e Antônio José Xavier de Oliveira, agradeço pelo amor incondicional, pela confiança, pelo exemplo de caráter e principalmente por me mostrarem que sempre devemos tentar ser melhor a cada dia e pelo esforço para garantir que seus filhos tivessem uma boa educação;

Aos meus irmãos, Jardeline, Jader e Janyelle, por estarem sempre presentes, seja nas alegrias ou na tristeza; agradeço-lhes também pela confiança, por acreditarem em meu potencial, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos;

Agradeço a minha segunda família, Maura, Henrique, Rayla, Aparecida e Mariana, por toda ajuda e apoio, e por tornarem meus dias menos pesados, além do carinho e respeito nesses cinco anos de convivência;

A minha incrível orientadora Dr. Ana Carolina Landim Pacheco, que confiou em mim e me apresentou um mundo de conhecimento e de coisas ao qual hoje sou encantada e pretendo trabalhar a minha vida toda, agradeço pela compreensão e apoio;

Ao meu co-orientador Dr. Edson Lourenço Silva, por toda atenção dada durante minhas dúvidas e na elaboração das PCR;

Aos amigos e colegas de laboratório Lucas e Jailson, por todo o ensinamento no momento de realização e obtenção dos meus resultados.

As alunas Carolina e Larissa pela participação e cooperação neste trabalho durante as coletas em Oeiras;

Agradeço ao pessoal do Centro de Doenças Negligenciadas de Oeiras, por todo apoio e parceria para que esse trabalho se concretizasse;

Aos amigos de curso Augusto, Dani, e os demais que contribuíram também para a concretização desse sonho, ajudando a enfrentar todas as etapas a nós imposta.

Aos meus amigos de longa data, os integrantes do Clube da Katy, por todas as distrações, por toda ajuda mesmo que indiretamente e por todas as risadas e momentos, que me ajudava a suportar os momentos difíceis.

Ao grupo LAPEDONE, que sem ele, muita coisa dessa pesquisa não seria possível, e que saibam que é uma honra ser integrante de uma equipe liderada por esses grandes e exemplos de professores.

E agradeço também, a muitas pessoas ao qual não foram citadas aqui, mas que de certa forma contribuíram para a realização deste sonho e para a construção da pessoa que sou hoje.

"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra!

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.

Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma enfermidade negligenciada, infecciosa, causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Transmitida pelo mosquito vetor flebótomo fêmea, ela possui como principal reservatório os cães domésticos, atingindo principalmente regiões pobres de clima tropical e subtropical. O objetivo do trabalho foi analisar a eficácia de dois testes de diagnóstico, um sorológico, o teste rápido imunocromatográfico DPP[®], utilizado pelo Centro de Doenças Negligenciadas de Oeiras-Piauí, e outro molecular, a PCR, que vem se mostrando como mais uma alternativa para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Foram coletadas 22 amostras de tecido de baço, fígado e linfonodo de nove cães diagnosticados como soropositivos e conseqüentemente enviados a eutanásia. Foi realizada a análise das biópsias dos tecidos em laboratório, através do método de PCR. Os resultados tiveram concordância total, sendo todos os cães confirmados como positivos para LVC. A concordância dos resultados dos testes sorológicos e moleculares sugerem um avanço na qualidade dos testes rápidos para o diagnóstico de LVC, trazendo uma maior confiança para a população do município, quanto aos resultados do teste realizado em seus animais.

Palavras-chave: Diagnóstico, Leishmaniose Visceral Canina, TR DPP[®], PCR.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis is a neglected, infectious disease caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. Transmitted by the female mosquito vector, it has as main reservoir domestic dogs, reaching mainly poor regions of tropical and subtropical climate. The objective of the study was to analyze the efficacy of two diagnostic tests, one serological test, the rapid immunochromatographic test DPP®, used by the Center for Neglected Diseases of Oeiras-Piauí, and another molecular, the PCR, which has been shown as another alternative for the diagnosis of Visceral Canine Leishmaniasis. Twenty-two samples of spleen, liver and lymph node tissue were collected from nine dogs diagnosed as seropositive and sent to euthanasia. Laboratory tissue biopsies were analyzed using the PCR method. The results were totally concordant, with all dogs confirmed as positive for LVC. The concordance of the results of the serological and molecular tests suggests an advance in the quality of the rapid tests for the diagnosis of LVC, bringing a greater confidence to the population of the municipality, as to the results of the test performed in their animals.

Keywords: Diagnosis, Canine Visceral Leishmaniasis, TR DPP®, PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Forma promastigota	20
Figura 2 - Forma Amastigota.....	20
Figura 3 – Fêmea do flebotomíneo adulto	22
Figura 4 - Desenvolvimento das leishmanias no vetor e infecção de hospedeiros ..	24
Figura 5 – Coleta de sangue capilar para realização de teste rápido no campo	26
Figura 6 – Procedimento de realização do Teste rápido em campo.	26
Figura 7 – Município de Oeiras, Piauí	29
Figura 8 - Tanque de eletroforese em gel MultiSUB Midi	32
Figura 9 - Termociclador modelo MJ MiniCycler PTC-150	33
Figura 10 - Animal 2 sintomático	34
Figura 11 - Gel de agarose da segunda PCR.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	20
Quadro 2 – Classificação geral de flebotomíneos ao nível de subfamília.	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BM- Banho Maria

DPP[®] - Dual Path Platform

ELISA- Imunoensaio Enzimático

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase- quantitativa

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SFM- Sistema Fagocítico Mononuclear

TE- Tris EDTA

TRI -Teste Rápido Imunocromatográfico

µl - Microlitro

µm- Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REFENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Leishmaniose Visceral	16
3.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	17
3.2.1 Outros reservatórios	19
3.3 Agente etiológico.....	20
3.3 Vetor	21
3.4 Ciclo biológico	23
3.5 Diagnósticos sorológicos.....	24
3.6 Diagnóstico molecular	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Área de estudo.....	29
4.2 Procedimentos de coleta.....	30
4.3 Procedimentos laboratoriais	30
4.3.1 Extração do DNA e PCR	30
5 RESULTADOS	34
5.1 Sinais Clínicos e alterações sistêmicas	34
5.2 Resultados do Teste rápido imunocromatográfico (DPP®)	35
5.3 Resultados do Teste PCR.....	35
6 DISCUSSÃO	36
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades infecciosas causadas por parasitas do gênero *Leishmania* (FARIA, 2014), de grande expansão geográfica, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, atingindo 62 países (DOURADO et al., 2007).

Desde a década de 70, vem se observando o processo da urbanização crescente da doença, além de mudanças no perfil epidemiológico clássico da Leishmaniose Visceral (LV) (LOPES et al., 2010).

As Leishmanioses apresentam uma diversidade de características clínicas e epidemiológicas, com grande afinidade pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme, mucosa e vísceras, especificamente na LV, os parasitos expressam acentuado tropismo pelo SFM do fígado, do baço, dos tecidos linfoides e da medula óssea (BRASIL, 2006; REY, 2008).

Em virtude da alta ocorrência, com estimativa de 900 000 – 1.300 000 novos casos e 20 000 a 30 000 mortes anualmente, atingindo principalmente crianças com desnutrição, portadores de HIV especialmente de regiões pobres, a LV encontra-se atualmente, entre as seis epidemias consagradas prioritárias no mundo, e que quando não tratada, podem evoluir para óbito em mais de 95% dos casos (OMS, 2017).

Os cães domésticos (*Canis familiares*) contêm um papel primordial na disseminação da doença, sendo considerado o principal reservatório dessa endemia por apresentar uma abundância de formas amastigotas na sua pele (FARIA; ANDRADE, 2013).

Rotineiramente, no Brasil, o diagnóstico nos cães é feito pelo teste rápido, confirmado pelos testes sorológicos de imunofluorescência indireta (RIFI), e/ou teste de ELISA, que pode ser utilizada para um grande número de amostras em curto espaço de tempo (BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

O diagnóstico baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem se mostrado como mais uma alternativa para o diagnóstico da LV, devido sua especificidade e sensibilidade por permitir a identificação e amplificação seletiva do DNA de *Leishmania* (ARAÚJO, 2007).

Ainda que haja tratamento e diagnósticos específicos para a LV, uma grande parte da população brasileira ainda se encontra sem acesso a esses recursos (DOURADO et al., 2007).

Devido ao aumento do índice de cães diagnosticados com Leishmaniose Visceral Canina no município de Oeiras, Piauí e uso e disponibilidade de apenas um tipo de diagnóstico, oferecido pelo Centro de Doenças Negligenciadas do município, surge a importância e necessidade de se analisar a eficácia deste teste diagnóstico, com a finalidade de se verificar a sensibilidade e especificidade, para que se comprove a veracidade dos resultados, evitando o sacrifício errôneo de cães.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo comparativo entre dois métodos de diagnósticos da LVC analisando a sensibilidade e especificidade do teste rápido (DPP[®]) utilizado pelo Centro de Doenças Negligenciadas de Oeiras com relação a PCR.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os resultados obtidos com o teste rápido e PCR
- Comparar a eficácia da PCR utilizando fígado, baço e linfonodo dos cães enviados para a eutanásia.
- Comparar o resultado dos testes com a presença/ausência de sinais clínicos e alterações sistêmicas encontrados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leishmaniose Visceral

A LV também chamada por Kala-azar pelos habitantes de Assam na Índia, foi confundida durante muito tempo com outras endemias, devido ao seu caráter febril e por não chamar atenção pelas lesões naturalmente visíveis e sendo durante muito tempo descrita como “caquexia malárica” ou confundida com a anemia ancilostomótica por médicos. A sua descrição ocorreu em 1822 e a identificação do seu agente etiológico em 1903 (REY, 2008).

Existe uma grande dúvida, sobre como se deu a origem dessa enfermidade no Novo Mundo. Não se sabe se a mesma, tenha sido introduzida juntamente com a inclusão dos cães, ou se foi introduzida na época em que se iniciou a colonização européia (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV é considerada uma das enfermidades mais negligenciadas do mundo, atingindo principalmente as pessoas pobres e doentes de regiões distantes de centros urbanos, onde os centros de saúde são inadequados, escassos ou até inexistentes (OMS, 2010). A *Leishmania donovani* (Laveran; Mesnil, 1902; Ross, 1903 (Velho Mundo)) e a *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) são as duas principais espécies causadoras da LV (WANDERLEY, 2011). A *Leishmania infantum*, recebeu este nome, porque em 1904, ela foi identificada em crianças que possuíam anemia esplênica infantil (ALVES, 2012).

No Brasil, o primeiro caso registrado da LV data de 1913, quando um material de necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso, foi analisado no Paraguai, e durante um estudo para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no país, encontrou-se 41 casos positivos de LV, a partir de análises de lâminas de indivíduos oriundo do Norte e Nordeste (BRASIL, 2014).

A presença de um vetor susceptível, de um hospedeiro e de um reservatório que também seja igualmente susceptível, são basicamente os principais fatores para que se tenha a ocorrência da LV em uma determinada área (GONTIJO; MELO, 2004).

A pobreza é um dos motivos que contribui para o aumento do risco de contrair a LV, uma vez que, as moradias simples e frágeis, e sob circunstâncias sanitárias precárias, como a falta de rede de esgoto, propiciam a presença do inseto vetor.

Essa doença também está estreitamente relacionada a alterações do ambiente, como na construção de barragens, urbanização e também migração de pessoas com sistema imunológico fraco para as áreas endêmicas. (ALVES, 2012; SANTOS et al., 2014).

Sabe-se que a principal forma de transmissão da doença, ocorre através da picada do inseto vetor fêmea dos flebotomíneos. Entretanto outras formas menos comuns, também já foram descritas, como uso de drogas injetáveis, devido ao compartilhamento de seringas e outros materiais perfuráveis, por transfusão de sangue, por via congênita e por meio de acidentes em laboratórios, mesmo que pouco se saiba e que não se tenha significância epidemiológica, já houveram registros de casos (NEVES, 2005; NEVES, 2011).

Essa enfermidade acomete com mais frequência crianças menores de 10 anos, principalmente as que se encontram na faixa etária de um a quatro anos de idade, sendo o sexo masculino proporcionalmente o mais afetado (WANDERLEY, 2011).

No Brasil, por conta de fatores de temperatura, de clima e de vegetação, a LV tem ocorrência especialmente nos estados do Ceara, Piauí, Bahia e Maranhão, acometendo principalmente as pessoas de classe socioeconômica baixa, por serem carentes de cuidados à saúde (ALVES, 2012; SANTOS et al., 2014).

No ano de 1980 o Piauí foi palco de uma epidemia, observando-se que a mesma atingiu uma grande extensão do território, principalmente na região da capital, Teresina. (COSTA et al., 1990; SILVA et al., 2007).

O controle da LV no Brasil, a 60 anos, é realizado através de três práticas: o uso de inseticidas contra os vetores, para a diminuição da sua densidade populacional, diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos e a identificação e eutanásia dos cães (CARDOSO, 2014). Dentre estas medidas a mais questionável é a eliminação dos cães, onde a mesma também envolve a situação de cunho afetivo do dono com o animal diagnosticado (FARIA, 2014).

3.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A presença do parasito da LV em cães, foi encontrada pela primeira vez por Nicolle e Comte na Tunísia no ano de 1908. Com esta observação, naquela mesma época, já estabeleceram a ideia de que os cães seriam os possíveis reservatórios dessa enfermidade (NEVES, 2005).

A disseminação desta doença é favorecida por diversos fatores como o contato direto com o principal reservatório (cão), assim como, o desmatamento, que promove o aumento da migração do vetor para os centros urbanos. A grande população canina associada à na maioria das vezes, a vida transitória entre o ambiente domiciliar e as ruas, gera o aumento dessa propagação, isto porque, a contaminação canina precede a humana (CARVALHO, 2015; GALVÃO, 2016). Até agora, não se verificou nenhuma predisposição racial, etária ou sexual relacionada com a infecção do animal (BRASIL, 2014).

Após a infecção da pele em cães susceptíveis, ocorre a disseminação do parasita por todo o corpo, desenvolvendo em seguida os sintomas (BRASIL, 2014).

Após a infecção, alguns sintomas são de ocorrência comum entre os cães, onde eles apresentam um quadro de características clínicas, que vão de um estado sadio a um severo. O período de incubação que pode durar de 3 a 6 meses, ou até anos, evolui para a forma latente, que por sua vez, pode evoluir para a forma aguda, subaguda, crônica ou regressiva. A enfermidade canina no geral, assemelha-se à humana (MARZOCHI, et al., 1985).

A LVC, apresenta como sintomas lesões cutâneas, particularmente descamação e eczema, na região nasal e orelhas, podendo provocar úlceras rasas, mais frequentemente nas regiões das orelhas, focinho, articulações e cauda, e o pelo pode ficar opaco. Quando ela se encontra em um estado mais avançado, o animal tende e com grande frequência a ter onicorrigose, que é uma distrofia adquirida, onde as unhas tornam-se mais espessas, aumentam de tamanho bastante rápido, curvam-se como o chifre de um carneiro, adquirindo uma coloração mais escura. Além de ocorrer a esplenomegalia, alopecia, dermatites, linfadenopatia, coriza, apatia, ceratoconjutivite, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, hiperqueratose, além disto, vômito. Na fase final da infecção, acontece em maioria, a perda da motricidade das patas (BRASIL, 2006).

Metade dos soropositivos são assintomáticos, levando a uma complicação nas análises clínicas e, portanto, sendo mais indicado o diagnóstico parasitológico, no qual se visualiza o parasito no material colhido por meio de punções, seja ela hepática, dos linfonodos, da medula óssea ou outras, uma vez que oferece uma maior confiabilidade (BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, a maioria dos sinais observados nos cães são comuns a outras patologias caninas, como erlichiose e babesiose. E o processo de imunossupressão que a enfermidade provoca no cão, favorece infecções oportunistas, que dificultam ainda mais o

diagnóstico clínico. Tudo isso demonstra que o diagnóstico definitivo e com confiabilidade, requer a associação entre os exames clínicos, epidemiológicos, sorológicos e parasitológicos (FARIA, 2014).

A doença no cão, geralmente é crônica e sistêmica, entretanto a evolução aguda é grave, podendo levá-lo a óbito em poucas semanas; em alguns casos, ela se mantém na forma latente, ocorrendo até a cura espontânea do animal. No Brasil o índice da forma assintomática varia, representando geralmente de 40 a 60% de uma população de cães soropositivos (BRASIL, 2014).

Os cães podem ser classificados em quatro estágios, após a avaliação clínica e laboratorial. O primeiro corresponde aos cães classificados como expostos, ou seja, que tiveram o diagnóstico parasitológico com resultado negativo, assim como baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e se encontram clinicamente normais, ou com sintomas associados a outras enfermidades; o segundo é o estágio dos cães infectados, que tiveram diagnóstico parasitológico positivo, porém possuem baixos níveis de anticorpos e são saudáveis clinicamente ou apresentam sintomas compatíveis com outras doenças; no terceiro, estão inclusos os cães doentes, com exame parasitológico positivo e com altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, possuindo um ou mais sintomas comuns da Leishmaniose; no estágio quatro estão os cães que se encontram severamente doentes, com condições clínicas severas, como nefropatia ou insuficiência renal crônica, possuindo também alterações oftálmicas, articulares, entre outros sintomas (CAMPOS, 2014).

3.2.1 Outros reservatórios

Os reservatórios da LV, variam do ambiente silvestre para as áreas urbanas. No silvestre os animais mais comuns usados como reservatórios são, as raposas e os marsupiais, já nas áreas urbanas o animal que possui a função de reservatório é o cão doméstico. Alguns estudiosos veem questionando o papel do homem e do gato como reservatórios da LV (MAIA, 2013).

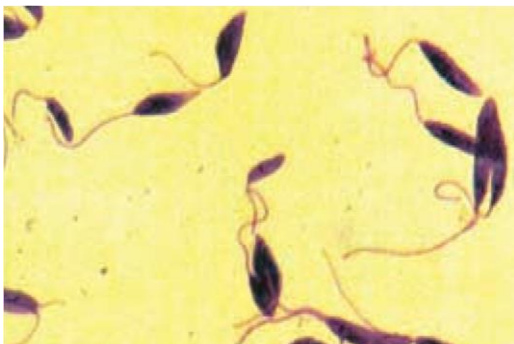
No Nordeste do Brasil, no norte do Estado de Minas Gerais e na Venezuela, foi registrado a presença do parasito em ratos domésticos (NEVES, 2005).

3.3 Agente etiológico

A LV é provocada pelo parasitismo dos protozoários do gênero *Leishmania* (NUNES et al., 2007), principalmente os do complexo *Leishmania donovani* (MAIA, 2013), que incluem a *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. donovani* (CARVALHO, 2009).

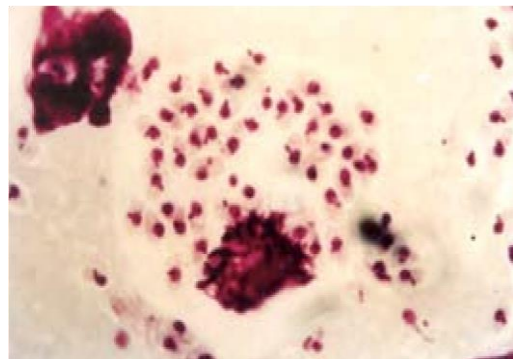
Pertencentes a família Trypanossomatidae (Quadro 1), esses protozoários unicelulares de pequeno tamanho, apresentam duas formas durante seu ciclo de vida (NEVES, 2011), a forma promastigota, que se caracteriza por ser fusiforme e com longo flagelo que emerge na região anterior e que regularmente é maior que o corpo, possuindo núcleo semelhante ao os da forma amastigota. O tamanho desses parasitas pode variar de 16,0 a 40,0 μ m de comprimento, por 1,5 a 3,0 μ m de largura e se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (Figura 1). A forma amastigota possui morfologia arredondada e com curto flagelo que não se exterioriza, sendo parasita intracelular em tecido de hospedeiros vertebrados. O citoplasma dessa forma cora-se de azul-pálido, onde pode-se observar vacúolos; o tamanho das formas amastigotas, varia entre 1,5 a 3,0 μ m de comprimento por 3,0 a 6,5 de largura (Figura 2) (NEVES, 2005; MAIA, 2013).

Figura 1 – Forma promastigota



Fonte: BRASIL, 2006

Figura 2 – Forma amastigota



Fonte: BRASIL, 2006

Quadro 1 – Taxonomia do gênero *Leishmania*

Reino	Protista (Haeckel, 1866).
Sub-reino:	Protozoa (Goldfuss, 1817).

Filo	Sarcomastigophora (Honigberg; Balamuth, 1963).
Subfilo	Mastigophora (Deising, 1866).
Classe	Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
Ordem	Kinetoplastida (Honigberg, 1963; emend. Vickerman, 1976).
Subordem	Trypanosomatina (Kent, 1880).
Família	Trypanosomatidae (Dofein, 1901; emend. Grobden 1905).
Gênero	Leishmania (Ross, 1903).
Espécie	Leishmania chagasi (Cunha; Chagas, 1937).

Fonte: MAIA, 2013

As espécies de *Leishmania* podem variar conforme a região geográfica, onde a *L. donovani* é agente típico do Calazar na África Oriental, na Índia e na China, infectando principalmente indivíduos adultos; a *L. infantum* provoca a LV no Mediterrâneo, na África Ocidental e Central, assim como no Oriente médio e na China, acometendo principalmente crianças, já a *L. chagasi*, é o agente causador do Calazar nas Américas, onde infecta tanto crianças como adultos (REY, 2008)

A alimentação desses protozoários é saprozóica, um tipo de alimentação em que esses organismos absorvem substâncias inorgânicas, já decompostas e dissolvidas em meio líquido, contidas no citoplasma das células que as alojam. Eles reproduzem-se por divisão binária, um tipo de reprodução assexuada, pelo qual uma célula divide-se, gerando duas células-filhas idênticas (MATSUMOTO, 2014).

3.3 Vetor

A enfermidade é propagada pela picada do mosquito flebótomo fêmea, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Quadro 2), a qual são conhecidas mais de 90 espécies que medem de 1 a 3 mm de comprimento. O mosquito possui antenas longas e segmentadas, asas com formato lanceolado e recobertas por cerdas longas, com cor-de-palha ou castanho-claros (Figura 3), são mais ativos do crepúsculo ao amanhecer, e são de fácil identificação pela sua forma de pouso, por voarem em pequenos saltos e pousar com as asas eretas e entreabertas, sendo

conhecidos no Nordeste por “asa-dura”, “cangalha” e “orelha-de-veado” (REY, 2008; OMS, 2017).

Quadro 2 – Classificação geral de flebotomíneos ao nível de subfamília.

Domínio	Eukaryota (Whittaker; Margulis, 1978).
Reino	Animalia (Linnaeus, 1758).
Filo	Arthropoda (Latreille, 1829).
Classe	Insecta (Linnaeus, 1758).
Ordem	Diptera (Linnaeus, 1758).
Subordem	Nematocera (Scopoli, 1786).
Família	Psychodidae (Newman, 1834).
Subfamília	Phlebotominae (Rondani, 1840).

Fonte: Santos, 2011.

A região superficial do corpo deste mosquito, é bastante permeável, onde apresentam uma camada de revestimento quitinoso delgado, e é devido a essa característica, que precisam se abrigar diariamente para que possam se proteger das alterações inesperadas que acontecem no meio ambiente (RÊGO, 2013).

Figura 3 – Fêmea do flebotomíneo adulto



Fonte: Brasil 2006

Os flebotomíneos vivem preferivelmente próximo da vegetação em raízes, ou próximo dos troncos de árvores, que são abundantes em matéria orgânica, e possuem um raio de voo em média de 250 metros (MATSUMOTO, 2014). Suas

larvas preferem ambientes terrestres úmidos e com baixa luminosidade (BRASIL, 2006).

No Brasil, duas espécies deste mosquito, são responsáveis pela disseminação da doença, elas são a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A espécie *L. longipalpis* tem uma maior importância, pois a mesma se encontra presente nas cinco regiões do país (MAIA, 2013).

Tanto a fêmea como o macho necessitam de carboidratos provenientes de sucos vegetais e de secreções de afídeos, que servem como fonte de energia. No entanto, as fêmeas que podem viver em uma média de 20 dias, alimentam-se também de sangue, utilizando-o apenas para a maturação folicular ovariana (BRASIL, 2006; MATSUMOTO, 2014).

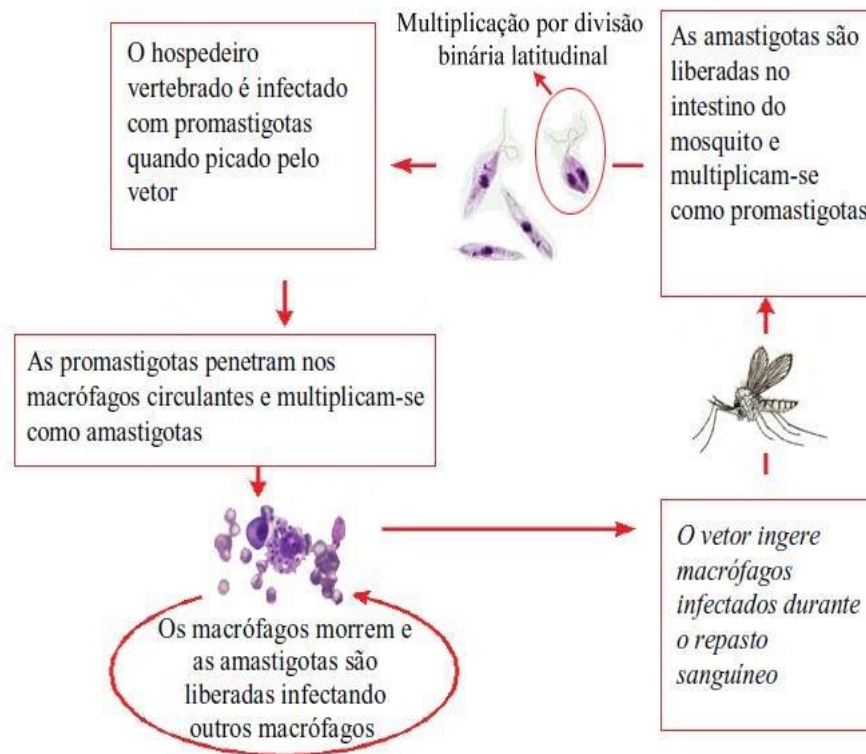
Esse vetor tem sido registrado tanto em ambientes rurais e urbanos como também em ambientes ecótopos naturais, perto dos animais domésticos, dentro das casas, em galinheiros, chiqueiro, paiol, canil, entre outros ambientes e também no intradomicílio. Possuem fácil adaptação ao ambiente peridomicílio e as variadas temperaturas (BRASIL, 2006; SILVA et al., 2007).

Fatores genéticos, entre outros, parecem controlar a resistência e suscetibilidade dos Flebótomos à infecção pelos protozoários da Leishmaniose, restringindo para algumas espécies a capacidade específica de realizar a transmissão de certas espécies do parasito (NEVES, 2005).

3.4 Ciclo biológico

O ciclo da enfermidade se inicia quando o hospedeiro invertebrado se infecta por ocasião do seu repasto sanguíneo no vertebrado, ingerindo as leishmanias sob a forma de amastigota. Chegando no estômago, ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as amastigotas. Após a liberação, essas formas se reproduzem e em seguida diferenciam-se em formas promastigotas, que também se multiplicam. Após um tempo entre 48 a 72 horas depois do repasto sanguíneo, a matriz peritrófica se rompe e as promastigotas livres migram para o intestino anterior, essas formas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas e o vetor então torna a se alimentar, regurgitando as formas junto com a saliva no hospedeiro vertebrado (Figura 4) (NEVES, 2011).

Figura 4 - Desenvolvimento das leishmanias no vetor e infecção de hospedeiros.



Fonte: Adaptada de BRASIL, 2006

A migração para as partes anteriores do aparelho digestivo, ocorrem em todas as espécies, provocando o comprometimento da válvula estomadeu, ocorrendo conseqüentemente a invasão da faringe e probócide (NEVES, 2005).

O ciclo biológico nos hospedeiros vertebrados inicia-se quando as formas promastigotas são regurgitadas juntamente com a saliva na pele do hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, nos quais se transformam em amastigotas (AIELLO; MAY, 2001). Já retornado as formas amastigotas, novamente começam a se dividir (URQUHART et al., 1998). Essa divisão se dá por cissiparidade simples causando destruição das células do SMF da pele, baço, fígado, medula óssea, nódulos linfáticos, mucosa e, também nos leucócitos (FORTES, 1997).

3.5 Diagnósticos sorológicos

O diagnóstico da LVC de modo 100% eficaz, apesar dos avanços que vêm sendo observados no que diz respeito ao desenvolvimento de vários métodos, ainda é um grande desafio (FARIA, 2014). Apesar dos vários avanços nos últimos anos

em relação aos diagnósticos, os que se encontram disponíveis, apresentam ainda a falta de 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004).

A dificuldade do diagnóstico, advém do fato de haver sintomas e sinais clínicos que não são específicos, podendo serem confundidos com várias outras enfermidades, como a Malária, Doença de Chagas e Esquistossomose (GONTIJO; MELO, 2004).

De uma maneira geral, o método de diagnóstico de recurso indireto mais utilizado, são os testes sorológicos. Esses testes possuem alguns problemas, como a ausência de protocolos padronizados, ausência de reagentes ou antígenos. Estes mesmos problemas são encontrados nos testes sorológicos de Leishmania, sendo até por vezes, não específico para as espécies existentes de Leishmania (READY, 2014). Inquéritos soroepidemiológicos no Brasil, são realizados desde a época da implantação do Programa de Controle (ARAÚJO, 2007).

O Ministério da Saúde no Brasil e o Programa de Vigilância e Controle da LV recomenda dois tipos de técnica sorológica para a detecção e confirmação da LVC, essas técnicas são, o teste imunocromatográfico (Teste Rápido ou TR DPP[®]) e o ELISA (BRASIL, 2015). Os testes imunocromatográficos estão entre os testes que possuem alta especificidade. Eles utilizam de um antígeno recombinante padronizado, que é codificado por um fragmento de um gene, mas possuem uma fraqueza, pelo fato de alguns anticorpos serem detectados muitos anos após a cura (READY, 2014). A especificidade deste teste varia de 90,8 - 100%, mas possuem uma sensibilidade baixa, que varia de 36,8 – 100 %, necessitando então de melhoras na sua sensibilidade (MAIA et al., 2012).

Os testes que se baseiam em antígeno recombinante rK39, são de fácil execução, baixo preço, rápidos e dão resultados reprodutíveis. Sendo utilizados para o diagnóstico precoce da LV (OMS, 2010).

O antígeno recombinante rK39 é constituído por um polipeptídeo, que possui uma repetição de uma quantidade de 39 aminoácidos, que são peça integrante de uma proteína pertencente à família Kinesin, que dentre as espécies de Leishmania viscerais é fortemente conservada (ARAÚJO, 2007).

Existe o TRI Dual Path Platform (DPP[®]), que faz uso de uma proteína recombinante rK28 como antígeno, sendo formada das proteínas rK9, rK39 e rK26. Este teste não está conseguindo manter a demanda nacional, ocasionando o uso de outras formas de diagnóstico. Os Kits destes testes só podem ser utilizados, se forem registrados no Ministério da Pecuária, da Agricultura e do Abastecimento.

Estão disponíveis no mercado com esse registro obrigatório o TRI de plataforma única, que tem a produção realizada pela empresa AlereTM, onde este TRI possui semelhanças com o TRI DPP®, sendo então uma nova opção de teste rápido imunocromatográfico para a o diagnóstico do Calazar (BRASIL, 2015). O teste de DPP® é recomendado para a triagem de cães (FARIA, 2014).

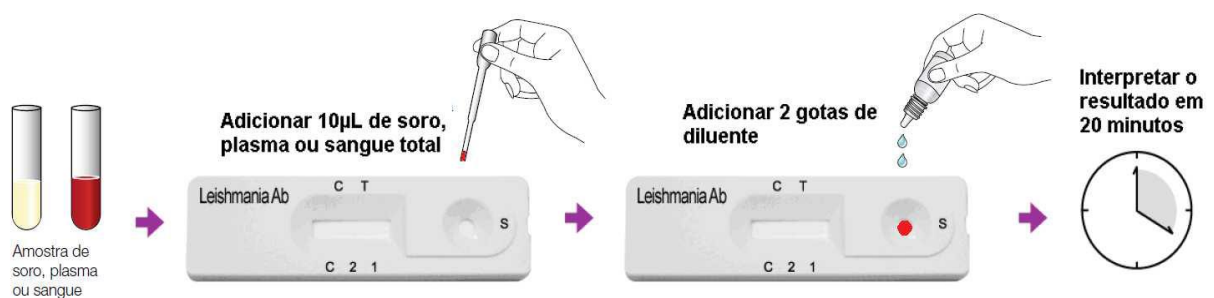
O procedimento para a coleta da amostra, ocorre inicialmente com a imobilização do animal, para que não ocorra acidentes na hora da coleta, em seguida deve ser feito a retirada da amostra de plasma, do soro ou do sangue total do animal. Em casos de teste em campo, faz-se o uso da lanceta para perfurar as patas, rabo ou orelha do cão a ser analisado, para em seguida, obter a amostra com a ajuda dos tubos capilares que permitem, a obtenção de 10µl de sangue (Figura 5). Neste tipo de teste a amostra deve ser adicionada imediatamente no cassete da plataforma teste, para que não haja o risco de coagulação da amostra, e para que também não ocorra interferência na ação do diagnóstico do teste (Figura 6) (BRASIL, 2015).

Figura 5 – Coleta de sangue capilar para realização de teste rápido no campo.



Fonte: BRASIL, 2015

Figura 6 – Procedimento de realização do Teste rápido em campo.



Fonte: BRASIL, 2015

O teste possui algumas letras gravadas na superfície do cassete, onde as mesmas interpretam resultados. Em um dos lados, esta gravada a letra T, que indica a linha teste e do outro lado a letra C, que já indica a linha de controle, elas só se tornam visíveis se o procedimento do teste estiver de forma correta e se os reagentes estiverem funcionando corretamente. Sempre que for detectada a presença de anticorpos anti *L. infantum*, a linha representante da letra T irá aparecer. O resultado sendo positivo, duas linhas surgiram, uma na linha da letra C e outra na linha da letra T, caso dê negativo, apenas uma linha será visível e será a correspondente a letra C, e se caso não aparecer nada na linha de controle, significa que o teste foi inválido (BULA, 2013).

No Brasil, esses testes sorológicos que se dão em resultados positivos, são suficientes para justificar a eutanásia de cães, mas falhas nesses resultados podem provocar a eliminação de um grande número desconhecido de animais não infectados (FARIA, 2014).

3.6 Diagnóstico molecular

Os estudos sobre metodologias fundamentadas na biologia molecular para a detecção do gênero *Leishmania*, se iniciaram a partir da década de 80 (SILVA, 2015).

Uma experiência considerável, vem sendo acumulada, a mais de uma década, desde o primeiro ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase para o diagnóstico da LV (CABRAL, 2007).

Métodos moleculares que fazem a detecção do DNA de *Leishmania*, veem se mostrando uma ferramenta de ótima utilidade, devido ao seu alto nível de sensibilidade, sua rapidez e sua especificidade, principalmente na detecção do DNA nos cães que são assintomáticos. Estudos em áreas endêmicas que fizeram o uso do método de PCR, confirmaram que o índice de predominância de cães infectados, é muito maior do que o número daqueles que desenvolvem os sintomas visíveis da enfermidade (SILVA, 2015).

A PCR é um método de amplificação gênica, que vem se mostrando cada vez mais útil, no que diz respeito principalmente ao diagnóstico e identificação das diferentes espécies de *Leishmania*, mesmo com o elevado custo (QUEIROZ, 2008).

A condição imunológica do animal nesse método, não interfere no resultado, já que a mesma, baseia-se na detecção do DNA do agente infeccioso (CAMPOS, 2014).

Esse método de amplificação do DNA do parasita, torna-se uma nova possibilidade para o diagnóstico da LV, apresentando uma porcentagem de 94% de sensibilidade (BRASIL, 2014).

Para a realização do processo de PCR atualmente, está sendo feito o uso de um pequeno volume de material biológico, e relatos demonstram que a mesma vem sendo utilizada com diferentes tipos de materiais clínicos, alvos moleculares e métodos de extração e purificação (CAMPOS, 2014). Entretanto, este método de diagnóstico, possui limitações para o seu uso em averiguações epidemiológicas, devido a pequena disponibilidade de material reagente, alto custo e a difícil adaptação ao trabalho em campo (ARAÚJO, 2007) além do que, para obtenção dos resultados de LV dessa técnica, existe a dependência de outros fatores, como o tipo de amostra analisada, área endêmica, o método de extração, entre outros (BRASIL, 2014).

Em testes comparativos com materiais de biópsias de pele de pacientes humanos que possuíam esporotricose, hanseníase e leishmaniose mucocutânea, observaram que a sensibilidade da PCR comparada ao exame parasitológico direto ao cultivo do parasita, foi muito maior (ARAÚJO, 2007).

Diferentes amostras, como biópsias de baço, fígado, linfonodo, medula óssea e amostras clínicas biológicas de aspirado de cães, podem estar sendo utilizadas para a detecção do DNA de *Leishmania sp.* através da PCR (ASSIS et al., 2010) por meio da amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* (NUNES et al., 2007). Mas existem coletas de amostras menos invasivas como as de sangue, pele e conjuntiva, e que podem apresentar até melhores resultados (ASSIS et al., 2010).

A ideia da inclusão do método de PCR em programas de vigilância e controle da LV, é enfatizada por alguns estudos, já que este método tem a capacidade de detectar infecções subclínicas, que juntamente com uma técnica sorológica, podem diagnosticar casos que não foram concluídos, que exibem reação cruzada ou um número baixo de títulos de anticorpos (SILVA, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O presente trabalho teve suas amostras coletadas no município de Oeiras-PI, cidade que possui atualmente 36.432 habitantes e possui como atual prefeito o José Raimundo de Sá Lopes (Figura 7). Em 2016 a área territorial do município era 2.702,486 Km² (IBGE, 2016).

Sendo um município da Microrregião de Picos, a mesma se localiza a uma latitude de 07° 01'30" sul e a uma longitude de 42° 07'51" oeste. Inicialmente denominada como Vila da Mocha, por ser localizada as margens do Riacho Mocha, teve seu nome alterado para Oeiras, em homenagem ao Conde de Oeiras, que seria o futuro Marquês de Pombal, que era o ministro da corte portuguesa (PMO, 2017)

A cidade de Oeiras é possuidora de um enriquecido patrimônio histórico, são séculos de muitas tradições culturais e religiosas, e é considerada a cidade mais antiga do estado do Piauí, sendo sede da primeira capital (OLIVEIRA et al., 2010). Foi sede até o ano de 1852, sendo transferida pelo Conselheiro Saraiva para a Chapada do Corisco, atual Teresina (IBGE, 2016).

Figura 7 – Município de Oeiras, Piauí



Fonte: Google imagens

4.2 Procedimentos de coleta

As coletas das amostras de 9 cães, foram realizadas nos dias 08 de julho de 2016, e em 9 de fevereiro de 2017, na cidade de Oeiras, Piauí, com apoio dos integrantes do Centro de Doenças Negligenciadas.

Na primeira coleta, quatro cães foram diagnosticados sorologicamente como positivos e enviados a eutanásia, destes quatro animais, foram retirados com auxílio de bisturi, pedaços de tecidos do baço, fígado e linfonodos. Todas as 12 amostras coletadas foram armazenadas em depósitos de material plástico, onde cada depósito foi identificado com a numeração de ordem de eutanásia.

Na segunda coleta, cinco cães foram diagnosticados sorologicamente como positivos e enviados a eutanásia, destes animais, foram retirados com auxílio de bisturi, pedaços de tecidos do baço, fígado e linfonodos. Todas as 10 amostras coletadas foram armazenadas em depósitos de material plástico, onde cada depósito foi identificado com a numeração de ordem de eutanásia.

No total foram coletadas 22 amostras de fígado, baço e linfonodo. Todo o material coletado, foi armazenado em congelador de geladeira a uma temperatura aproximada de -18°C .

4.3 Procedimentos laboratoriais

4.3.1 Extração do DNA e PCR

Os procedimentos laboratoriais, foram todos realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI).

O DNA genômico de 17 amostras foram extraídos pelo método modificado a partir do descrito por Milligan (1998) e cinco amostras de acordo com o protocolo do Kit Quick DNA™ Universal kit (Catalog Nos D4068 & D4069).

A partir do método modificado, foi removida uma quantidade reduzida de tecido de cada amostra, essas quantidades foram lavadas com Tris- HCl 10 mM, PH 7,5 e colocadas em tubos do tipo eppendorf, adicionando 300 μl de Tampão de extração, onde foi adicionado em seguida, 40 μl de Proteinase K. Tudo foi misturado e levado a banho maria (BM) a uma temperatura de 65°C , em um tempo de duas a

três horas, agitando-as ocasionalmente por inversão (20 em 20 min) até a dissolução do tecido.

Foram retirados do BM, vortexadas e centrifugadas rapidamente, depois adicionou-se 100 µl de NaCl 5M, após a adição, as amostras foram agitadas durante 10 min no Vortex e centrifugadas a 13.000 rpm por também 10 min.

Foram removidos e transferidos cuidadosamente o sobrenadante que foi formado, para outros eppendorf limpos de formato cônico, sem perturbar a interfase. Adicionou-se nos eppendorf uma quantidade um ml de álcool P.A. gelado, e em seguida, fez se a mistura, para a formação da medusa.

Depois, foi realizada uma nova centrifugação a 13.000 rpm, por 10 min, separando a fase aquosa, desprezando-se em seguida, o sobrenadante cuidadosamente, observando-se o pellet formado.

Após descarte do sobrenadante, lavou-se a amostra adicionando-se 500 µl de álcool 70%, as amostras foram agitadas e em seguida centrifugadas, desprezando novamente o sobrenadante. Essa etapa de lavagem foi repetida mais uma vez e finalmente depois do último descarte o tubo foi invertido e colocado sobre papel absorvente até ocorrer a secagem.

Com a secagem realizada, foi adicionado 50 µL de TE, onde foi agitado e levado a BM a 55 °C por aproximadamente 15 min até a dissolução, depois de finalizado todo o processo, as extrações foram estocadas na geladeira.

Nas extrações realizadas através do protocolo do Kit, foi retirada uma quantidade de amostras de aproximadamente 25 mg e adicionadas em tubos, com uma solução de 95 µl de água, 95 µl de tampão de tecido sólido (azul) e 10 µl de Proteinase K. Fez-se a mistura e incubou-se o tubo a 55 °C durante três horas, até o tecido se solubilizar e homogeneizar. Em seguida o material foi separado dos detritos insolúveis, através de centrifugação a 12.000 rpm durante um min. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo.

Depois de separado o sobrenadante, foi adicionado dois volumes de tampão de ligação genômica, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por um min, sendo feito após o descarte do sobrenadante. Feito o descarte, foi adicionado 400 µl de tampão de pré-lavagem de DNA ao tubo e centrifugado por um min, sendo em seguida descartado novamente o sobrenadante, logo depois, foi adicionado mais 200 µl de tampão de lavagem e a mistura centrifugada por um minuto e novamente descartado o sobrenadante.

Para a eluição do DNA, o material foi transferido para um tubo de micro centrífuga limpo, adicionou-se 50 µl de tampão de eluição de DNA, incubou-se por 5 min e em seguida, centrifugou-se por um min, finalizando o último processo de extração. O DNA extraído através do protocolo do Kit, também foi estocado na geladeira.

Antes da reação de PCR, as amostras de DNA genômico extraído foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% por 30 minutos a 60 V, contendo SYBR Safe como corante do DNA, em Tanque de eletroforese em gel MultiSUB Midi (Figura 8).

Figura 8: Tanque de eletroforese em gel MultiSUB Midi



Fonte: Autoria própria

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme Quinnell et al. (2000), 1999, foi realizada nos dias 20/10 e 08/11 de 2017, para amplificar fragmentos de aproximadamente 805 pb do minicírculo do cinetoplasto do grupo *L. donovani* (SMYTH et al. 1992; SCRIMGEOUR et al. 1998). A primeira reação teve volume final de 25µL, contendo 0,5 µL de DNA genômico; 0,5 µL de cada primer, AJS31 (50-GGG GTT GGT GTA AAA TAG GGCC-30) e DBY (50-CCA GTT TCC CGC CCC GGA G-30) (QUINNELL et al. 2000) (Invitrogen®), armazenados em uma concentração de 10pM/µL; 19,55 µL de água Milli-Q; 2,5 µL de Tampão PCR; 0,75 µL de MgCl; 0,5 µL de mix dNTPs e 0,2 µL de Taq Platinum (Invitrogen®), nessa primeira PCR, apenas 4 amostras foram utilizadas.

A reação de amplificação foi realizada num aparelho termociclador modelo MJ MiniCycler PTC-150 (Figura 9), consistindo de um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C (30 seg), 67°C (1min) e 72°C (1min),

com extensão final de 72°C por 10 min. A segunda reação, teve volume final de 12,5 µL, que foi utilizado e multiplicado para um total de 19 amostras, onde umas das amostras, correspondente ao DNA extraído do baço do animal dois, que já havia passado pelo processo de PCR e foi refeita. Esse volume final foi dado, a partir, da metade do volume final do primeiro Mix.

Figura 9: Termociclador modelo MJ MiniCycler PTC-150



Fonte: Autoria própria

Após a PCR, os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% por 30 minutos a 60 V, contendo SYBR Safe e como Padrão 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), como banda de controle. O resultado foi visualizado em aparelho transiluminador LED 470 NM Kasvi, em que foi possível verificar a qualidade das amplificações obtidas, com uma única banda, intensa, bem definida e com tamanho correspondente ao esperado no caso de animais positivos e a ausência de banda nos animais negativos.

As análises dos resultados tiveram o exame molecular como padrão ouro para validar o teste sorológico rápido.

5 RESULTADOS

5.1 Sinais Clínicos e alterações sistêmicas

Nove cães foram enviados para o Centro de Doenças Negligenciadas para a realização do teste rápido imunocromatográfico (DPP®) todos os 9 animais tiveram resultado positivo para o diagnóstico sorológico e foram encaminhados a eutanásia, com consentimento dos donos.

Do total de animais diagnosticados, apenas um, que foi descrito como animal 2, aparentava sinais clínicos visíveis, os demais se encontravam na categoria de assintomáticos. Dentre os sinais destacava-se a desnutrição, onicorrigose e lesão cutânea, como úlcera na articulação (Figura 10). Neste mesmo animal, no momento da coleta dos tecidos, foi possível observar os danos da enfermidade no fígado, onde o mesmo encontrava-se amarelado, entrando na categoria de alterações sistêmicas.

Figura 10: Animal 2 sintomático



Fonte: Autoria própria

Dos demais animais dados como assintomáticos, dois apresentaram esplenomegalia, a saber animal um e sete

5.2 Resultados do Teste rápido imunocromatográfico (DPP®)

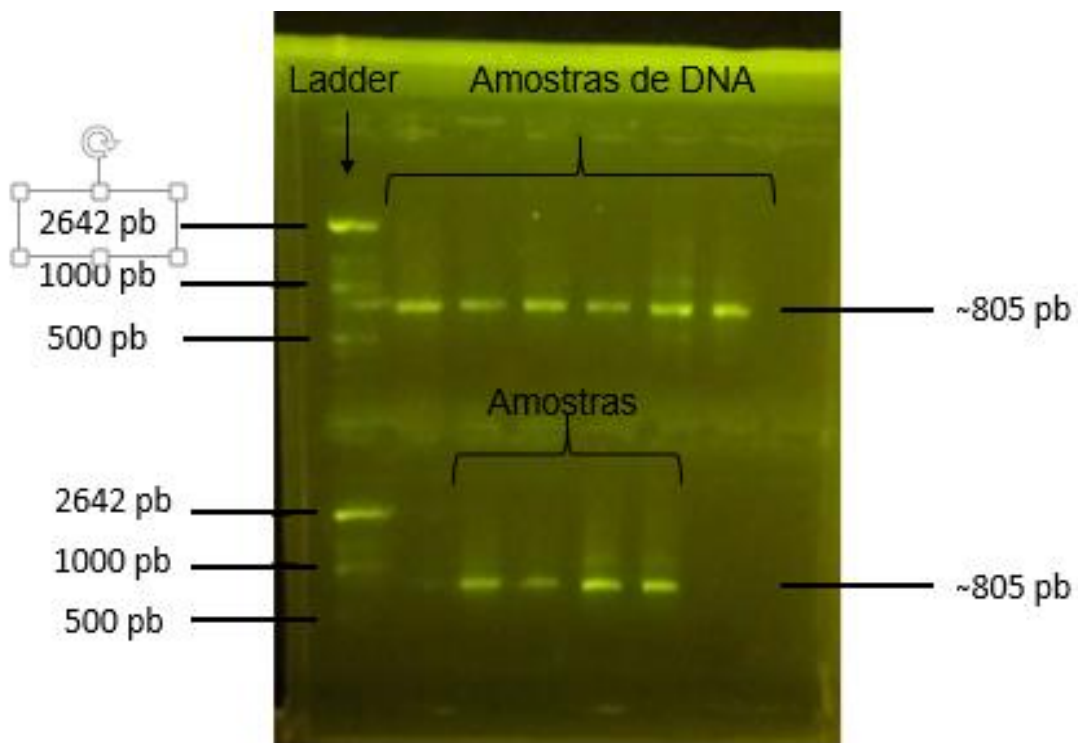
Os resultados de todos os testes rápido imunocromatográfico (DPP®) se deram como positivos para LV.

5.3 Resultados do Teste PCR

Através do gel de agarose, foi possível observar que todos os nove cães eram positivos para LVC, onde se detectou parasitismo em todas as amostras de tecido de baço, fígado e linfonodo.

Depois de cada processo de PCR, os fragmentos do gene específico foram amplificados pelos primers em aproximadamente 805 pb (Figura 11).

Figura 11: Gel de agarose da segunda PCR.



Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

Apesar do grande avanço tecnológico advindo do século XX ter gerado uma variedade de técnicas laboratoriais, trazendo principalmente uma grande contribuição para o diagnóstico de muitas enfermidades e em especial das infecciosas, houve poucos avanços com relação ao diagnóstico da LV nas últimas décadas. Dois motivos para os poucos avanços são por se tratar de uma doença negligenciada, o que prediz um pequeno retorno no comércio com relação a investimentos em pesquisa, e também pela complicação biológica da própria infecção (ASSIS et al., 2008).

Muitos dos cães que se encontram infectados pela LVC podem ser assintomáticos e permanecer aparentemente saudáveis por toda a vida, desenvolvendo uma natural resposta imune celular, tornando-se até resistentes à doença (ASSIS et al., 2010). Corroborando com resultado encontrado, que dos nove cães positivos para LVC, oito eram assintomáticos.

Os testes sorológicos podem apresentar resultados falso positivos por conta de reações inespecíficas ou cruzadas com outros patógenos, além de serem ineficientes para diagnóstico no período entre a infecção e soroconversão (QUEIROZ, 2008). O que não pode ser confirmado pelo presente estudo que teve todos os cães diagnosticados como soropositivos e confirmados pela PCR, demonstrando uma boa eficiência do teste rápido imunocromatográfico (DPP[®]),

Em recentes estudos que avaliam o TRI DPP[®] para o diagnóstico da LVC, foi revelado falhas com respeito a sensibilidade e na capacidade de detecção de cães assintomáticos utilizando este teste rápido (REIS, 2013), o que não foi compatível com o presente resultado, que mostrou uma boa eficácia do TRI DPP[®], apresentando uma boa sensibilidade e capacidade de detecção em cães assintomáticos. No trabalho de Nóbrega (2014) o TRI DPP[®] apresentou uma concordância razoável (0,35) com valores de sensibilidade e especificidade de 61% e 86%, respectivamente com relação a qPCR.

Um teste de diagnóstico que seria considerado ideal para a LVC, deveria identificar todos os cães que estivessem infectados, e não os cães que não estivessem infectados, sendo um padrão ouro para a infecção (QUINNELL et al., 2000). Em estudos sobre a LV, o método de PCR tem sido utilizado com várias

finalidades, sendo descrito como um método sensível para a detecção do parasita, independente do histórico clínico (MELO, 2004). Legitimando os resultados positivos da PCR de todos os cães, até mesmo dos que se encontravam sem histórico clínico.

Neste estudo parasitismo foi detectado por PCR nas amostras de baço, fígado e linfonodo, igualmente como nas amostras de tecidos hepáticos, esplênicos e linfonodos dos cães submetidas a PCR de Assis e colaboradores (2010). A sensibilidade da PCR é maior em amostras de DNA extraídas de medula óssea, baço e linfonodos, apesar da coleta dessas amostras serem invasivas (SILVA, 2016).

A PCR tem se mostrado bem específica e sensível, podendo ser utilizada como mais uma alternativa no diagnóstico da LV (ARAÚJO, 2007), detectando de 89 a 100% das infecções sintomáticas ou comprovadas parasitologicamente (QUINNELL et al., 2000). Os resultados do estudo e de Silva (2010), com relação a PCR foram compatíveis, identificando 100% dos assintomáticos como positivo para a LVC, demonstrando a alta sensibilidade do diagnóstico, concordando também com Troncarelli e colaboradores (2006) em que a PCR obteve sensibilidade de 82%, e no de Quinnell e colaboradores (2000) a especificidade se mostrou alta, entre 98-100%.

Em muitos resultados existe uma discrepância na quantidade de animais diagnosticados com LVC no teste sorológico e no diagnóstico molecular, o que pode ser explicado por vários fatores, como a baixa quantidade de parasito no tecido, a permanência de anticorpos circulando mesmo depois da eliminação do parasita e reações cruzadas (MONTEIRO, 2014). Essa discrepância pode ser observada no estudo de Assis et al (2010) onde 60% cães foram soropositivos e 97% foram positivos no exame molecular. Entretanto essa diferença não foi observada nas amostras analisadas nesta pesquisa que mostrou uma consonância entre os resultados dos testes sorológicos e moleculares, sugerindo que os animais avaliados estariam em quadro de alta parasitemia mesmo sendo assintomáticos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concordância dos resultados dos testes sorológicos e moleculares sugerem um avanço na qualidade dos testes rápidos para o diagnóstico de LVC, entretanto a pequena quantidade de amostras utilizadas mostra a necessidade da realização de outras pesquisas para a obtenção de resultados mais confiáveis.

Diante de tantos recursos sorológicos e biomoleculares para realização do diagnóstico precoce da LVC, surge a necessidade de estudos que avaliem essas técnicas, e tornem disponíveis para a população e profissionais, os níveis de eficácia dos mesmos, demonstrando se há ou não a necessidade de se gerar novos diagnósticos, além disso, existem muitas dúvidas e oportunidades para o melhoramento destes testes, surgindo a necessidade de investimentos em pesquisa para se ter avanço nos diagnósticos, dando um passo a frente no contexto dessa enfermidade no mundo.

REFERÊNCIAS

- AIELLO, S. E, MAY, E. **Manual Merck de veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2003. 353 p.
- ALVES, E. **Fatores de risco para incidência de infecção por Leishmania infantum na cidade de Teresina, Piauí**. 53 f. Dissertação (Mestrado em Saude Coletiva) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, 2012.
- ARAÚJO, M. **Avaliação do antígeno recombinante k39, em teste imunocromatográfico, no diagnóstico da leishmaniose visceral canina endêmica na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil**. 2007. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2007.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, J. R.; BADARÓ, R.; DAVID J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C., SAMPAIO D. P.; BADARÓ R. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.59, p.53-57, 1998
- ASSIS, J; QUEIROZ, N; SILVEIRA, R; NUNES, C; SOUSA OLIVEIRA, T; JUNIOR, A; NEVES, M; MACHADO, R; BUZETTI, W. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan./mar. 2010
- ASSIS, T.; BRAGA, A.; PEDRAS, M; BARRAL, A; SIQUEIRA, I; COSTA, C; COSTA, D; HOLANDA, T; SOARES, V; MAURO BIÁIV; CALDAS, A; ROMERO, G; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 107-116, abr./jun. 2008.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**. n. 55, v. 3, p. 273-277, 1996.
- BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances in leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**. São Paulo, v. 40, n. 2, abr./jun. 2004.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1. ed. Brasília, 2014.

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

BULA. **Referência técnica: bula do Alere Leishmaniose Ac Test Kit**. Versão: 01, Junho 2013. Disponível em: <<http://www.doctorlab.com.br/docs/1450891092.pdf>>. Acesso em: 31/08/2017.

CABRAL, A. **Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania spp.*** 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista- UNESP, Botucatu, 2007.

CAMPOS, M. **Comparação entre amostras de pele íntegra parafinada e congelada através da reação em cadeia da polimerase -quantitativa (qpcr) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

CARDOSO, R. **Detecção molecular de espécies de *Leishmania* em mamíferos de unidades de conservação e entorno do distrito federal, Brasil**. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

CARVALHO, R. **Estudo da coinfeção *leishmania infantum* e *ehrlichia canis* em cães numa área endêmica para leishmaniose visceral canina**. 2015. 78 f. Dissertação (Doutorado em Patologia). Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Bahia, 2015.

CARVALHO, J. **Leishmaniose Visceral Canina: aspectos clínicos e de diagnóstico**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa mestrado em Ciência Animal. Campo Grande, 2009.

COSTA, C; PEREIRA, H; ARAÚJO, M. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde pública**, São Paulo, v. 24, p. 361-72, 1990.

DANTAS, F. **Situação atual da epidemiologia da Leishmaniose Visceral em Pernambuco**. 1. ed. Recife: Fundação Oswaldo Cruz. 2006. p. 1-6

DOURADO, Z; SILVA, H; LACERDA, E; ZAPATA, M. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**. v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez. 2007.

ELKHOURY, A. Análise dos registros de Leishmaniose Visceral pelo método de captura-recaptura. **Revista Saúde Pública**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 931-937, 2007.

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

FARIA, A; ANDRADE, H. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2013.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. São Paulo: ícone.1997. 686 p.

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

GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N.. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 1-23, 2004.

IBGE. **Piauí, Oeiras, infográficos: dados gerais do município**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=220700>>. Acesso em: 14 nov. de 2017.

LAINSON R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. PETERS AND R. KILLICK-KENDRICK, **The Leishmaniases in Biology and Medicine**.1. ed. p. 1–120. London: Academic Press. 1987.

LOPES, E; MAGALHÃES, D; SILVA, J; HADDAD, J; MOREIRA, E. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 5, p. 1062-1071, 2010.

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

MAIA, Z; LÍRIO, M; MISTRO, S; MENDES, C; MEHTA, S; BADARO, R. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v, 6, n. 1, p. 14-64, 2012.

MARZOCHI, M; COUTINHO, S.; SABROZA, P.; SOUZA, M; SOUZA, P; TOLEDO, L; FILHO, F. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de saúde pública**. Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, out./dez. 1985.

MATSUMOTO, P. **Análise espacial da leishmaniose visceral canina em presidente prudente - sp abordagem geográfica da saúde ambiental**. 2014. 147 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2014.

MELO, M. Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 23, n. 1, 2004.

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

MONTEIRO, A. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil**. 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

NEVES, D, P. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.

NEVES, D, P. **Parasitologia humana**. 12 ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2011.

NÓBREGA, G. **Comparação entre métodos recombinantes e pcr em tempo real no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B. DE; AZEVEDO, M.A.A; LIMA, V.M.F.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, F.C.S.1; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

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

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis. Ficha técnica**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 14 nov. de 2017.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, p. 22-26, mar. 2010.

PMO. Prefeitura Municipal de Oeiras. **Sobre o município**. Disponível em: <<http://oeiras.pi.gov.br/pagina-exemplo/>>. Acesso em: 12 nov. de 2017.

QUEIROZ, N. M. G. P. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a Rifi e Elisa-teste**. 2008. 125 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, 2008.

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

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. **Press Journal Clinical epidemiology**, n. 6, p. 147-154, 2014.

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

RÊGO, F. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil**. 2013. 151 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2013.

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

SANTOS, J; DIAS E SILVA, T, LIMA, D; MENDONÇA, I. Leishmaniose Visceral no município de Bom Jesus, Piauí. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 4, p. 236-241, 2014.

SANTOS, T. **Fotomicrografia digital para estudos taxonômicos de flebotomíneos do subgênero *Psychodopygus* do Estado do Pará, Brasil**. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de medicina tropical. Belem, 2011.

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

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

SILVA, F. **Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil)**. 2015. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SILVA, J; WERNECK, G; PIRES E CRUZ, M; COSTA, C; MENDONÇA, I. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p. 1715-1720, jul. 2007.

SILVA, S. **Impacto do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% na prevenção da leishmaniose visceral canina, no município de Juatuba, Minas Gerais**. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2010.

SILVA R.B.S; MENDES R.S; SANTANA V.L; SOUZA H.C; RAMOS C.P.S; SOUZA A.P; ANDRADE P.P; MELO M.A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.123, p.331-344, 2006.

TRONCARELLI, M.Z., LUCHEIS, S.B., CAMARGO, J.B., MACHADO, J.G., RIBOLLA, P.E.M., CABRAL, A.W.D., LANGONI, H. **Sensibilidade, especificidade e concordância de testes no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP. Botucatu, SP, 2006.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 1998. 273 p.

WANDERLEY, L. **Avaliação da especificidade dos primers rv1 e rv2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral**. 2011. 49 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães. Oswaldo Cruz. Recife, 2011.



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

Identificação do Tipo de Documento

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

Eu, Jussara Damascena de Oliveira,
 autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
 gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Análise de métodos de diagnóstico para a lei-
nhmaniose visceral canina
 de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
 de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 23 de Novembro de 20 18.

Jussara Damascena de Oliveira
Assinatura

Assinatura