

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SAYANNE LUNS HATUM DE ALMEIDA

**INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* EM CÃES DA CIDADE
DE CUIABÁ, MATO GROSSO, ENTRE 2021 E 2022**

Cuiabá – MT

2024

SAYANNE LUNS HATUM DE ALMEIDA

**INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania infatum* EM CÃES DA CIDADE DE
CUIABÁ, MATO GROSSO, ENTRE 2021 E 2022**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Cuiabá – MT

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A447i Almeida, Sayanne Luns Hatum de.
Incidência da infecção por *Leishmania infantum* em cães da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, entre 2021 e 2022 [recurso eletrônico] / Sayanne Luns Hatum de Almeida. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 85 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.
Coorientador: Luciano Nakazato.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.
Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.
Inclui bibliografia.

1. Diagnóstico. 2. Leishmaniose. 3. qPCR. I. Aguiar, Daniel Moura de, *orientador*. II. Nakazato, Luciano, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* EM CÃES DA CIDADE DE CUIABÁ, MATO GROSSO, ENTRE 2021 E 2022

AUTORA: Doutoranda Sayanne Luns Hatum de Almeida

Tese defendida e aprovada em 15 de maio de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutor Daniel Moura de Aguiar (Presidente Banca/Orientador)
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
 2. Doutora Thabata dos Anjos Pacheco (Examinadora Externa)
Instituição: Instituto Federal de Rondônia-IFRO
 3. Doutora Nathalie Moro Bassil Dower (Examinadora Externa)
Instituição: Universidade de Cuiabá-UNIC
 4. Doutor Paulo Roberto Spiller (Examinadora Interno)
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
 5. Doutora Lianna Ghisi Gomes (Examinadora Interno)
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
 6. Doutora Valéria Dutra (Examinadora Suplente)
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
- Cuiabá, 15 de maio de 2024



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL MOURA DE AGUIAR**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 15/07/2024, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAULO ROBERTO SPILLER**, **Técnico Administrativo em Educação do HOVET - Secretaria / FAVET - UFMT**, em 16/07/2024, às 08:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LIANNA GHISI GOMES, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 16/07/2024, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathalie Moro Bassil Dower, Usuário Externo**, em 17/07/2024, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thabata dos Anjos Pacheco, Usuário Externo**, em 17/07/2024, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador **6971922** e o código CRC **E3A42625**.

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus, meu filho Francisco e minha filha Anastasia, meu marido Leonardo, meus pais Jeanne e Samir e às minhas irmãs Samira e Renata com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos primeiramente a Deus que sempre iluminou meu caminho, que colocou pessoas maravilhosas em minha vida e que me deu forças para aguentar esses 4 anos de doutorado, além dos diversos momentos difíceis que passei nesse período.

Ao meu melhor amigo, namorado e marido pela força nos momentos em que quis desistir de tudo, pelo estímulo a continuar, por sempre segurar a barra nos momentos difíceis e por toda a atenção todos esses anos. Ao meu anjinho Francisco, que mesmo longe permanece pertinho aqui no meu coração, e que foi o meu maior Milagre. Sei que ele está lá de cima torcendo por mim e cuidando de mim e de toda nossa família. E ao meu segundo milagre, minha filha Anastasia, que voltou a trazer alegria para minha vida.

Aos meus pais Samir e Jeanne e meus padrinhos Soraya e Clóvis que sempre estiveram ao meu lado e a quem devo tudo, pois sem eles e sem seus incentivos provavelmente não estaria aqui. À minha irmã Samira pela paciência, por todo o carinho, por sempre ter estado do meu lado, por ser meu orgulho minha inspiração e ter sido sempre minha melhor amiga. À minha irmã amada, Renata, que mesmo com todas as diferenças sei que posso contar em todos os momentos. À minha família em geral, por todo amor e paciência e por me apoiarem mesmo estando a quilômetros de distância e vê-los pouco.

Aos meus amigos que carrego desde a época da faculdade, Juliana e Tarcísio, por sempre me apoiarem e estarem do meu lado em todos os momentos, de alegria e de tristeza. Obrigada por toda a paciência, todo o carinho e por poder contar sempre com vocês. Às amigas que fiz durante todo esse período de UFMT, Thábata, Mayara, Maerle, Nathalie e Amanda. A Nathy e a Priscila, grandes amigas e residentes durante esse período e que me acompanharam, me ajudaram e que sempre estiveram por perto e me aguentaram nos momentos de desespero e nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada meninas, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Daniel, que me acolheu e me ajudou em tudo que foi possível e realmente foi um orientador, obrigada por toda paciência e carinho. Aos meus amigos, professores e antigos orientadores Marcos Zanini e Graziela que tanto me ensinaram lá no início, que me despertaram o amor pela pesquisa e a quem vou ser grata sempre.

À minha banca, Nathalie, Thábata, Lianna e Paulo Roberto pela disponibilidade e pela contribuição para esse trabalho.

À Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), instituição onde fiz minha residência e estou finalizando agora meu doutorado. E obrigada principalmente a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), local que me formei e conclui meu mestrado e que passei a dar muito mais valor. Obrigada a todos os professores por todos os ensinamentos durante a graduação, vocês são excepcionais e apesar de todas as dificuldades que sempre tiveram fazem de tudo por seus alunos e eu vou sempre admirar vocês por isso.

À agência CAPES pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho.

RESUMO

As Leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas de evolução crônica e zoonóticas de relevância mundial. O presente trabalho objetivou estimar a incidência da infecção por *Leishmania infantum* em cães oriundos de diferentes clínicas e hospitais veterinários de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 e 2022. O diagnóstico foi baseado na detecção molecular do agente, inicialmente por qPCR *TaqMan* para detectar o kinetoplasto de *Leishmania* spp. seguida por testagem das amostras positivas por qPCR Sybr e *endpoint*PCR do gene da catepsina de *L. infantum*. Amostras que apresentaram disparidade entre as análises supracitadas foram testadas novamente com intuito de amplificar para fins de sequenciamento, o gene ITS de *Leishmania* spp. De 896 amostras testadas, 210 (23,44%) foram positivas para *L. infantum* pelo método qPCR *TaqMan*. A incidência de cães detectados com DNA de *Leishmania* sp., variou de 13,5% a 32,4%. A taxa de incidência da leishmaniose entre 2021 e 2022 foi de 0,23 casos por mês. A densidade de incidência foi ajustada para 234 casos a cada 1.000 cães por mês. Das amostras positivas pela qPCR *TaqMan*, 134 foram confirmadas pela reação de qPCR utilizando como alvo o gene da catepsina de *L. infantum*. E quando este protocolo foi avaliado em reação *endpoint*PCR foram observadas 114 amostras positivas, apresentando bandas de 223 pares de bases. Comparando com estudos anteriores na mesma região foi observada uma variação significativa nas taxas de prevalência de Leishmania Visceral Canina (LVC), que podem ser explicados por fatores ambientais e os métodos diagnósticos utilizados. A qPCR *TaqMan* mostrou-se mais eficaz na detecção durante todo o estudo, em comparação com o SYBR e a PCR convencional. Conclui-se que métodos diagnósticos rápidos e confiáveis são de extrema importância para controle e prevenção da LVC. Apesar de no presente estudo a qPCR *TaqMan* ter se mostrado mais eficaz e uma taxa de detecção maior, os dois métodos tem suas vantagens e limitações e a escolha depende nas necessidades específicas de cada estudo.

Palavras-chaves: diagnóstico, leishmaniose, qPCR.

ABSTRACT

Leishmaniasis are chronic, zoonotic, non-contagious infectious diseases of global relevance. The present work aimed to estimate the incidence of *Leishmania infantum* infection in dogs from different clinics and veterinary hospitals in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, between 2021 and 2022. The diagnosis was based on molecular detection of the agent, initially by *TaqMan* qPCR to detect the kinetoplast of *Leishmania* spp. followed by testing of positive samples by Sybr qPCR and endpointPCR of the *L. infantum* cathepsin gene. Samples that showed disparity between the aforementioned analyzes were tested again with the aim of amplifying the ITS gene of *Leishmania* spp. for sequencing purposes. Of 896 samples tested, 210 (23.44%) were positive for *L. infantum* by the *TaqMan* qPCR method. The incidence of dogs detected with *Leishmania* sp. DNA ranged from 13.5% to 32.4%. The incidence rate of leishmaniasis between 2021 and 2022 was 0.23 cases per month. The incidence density was adjusted to 234 cases per 1,000 dogs per month. Of the positive samples by *TaqMan* qPCR, 134 were confirmed by the qPCR reaction using the *L. infantum* cathepsin gene as a target. And when this protocol was evaluated in the endpointPCR reaction, 114 positive samples were observed, presenting bands of 223 base pairs. Comparing with previous studies in the same region, a significant variation in the prevalence rates of Canine Visceral *Leishmania* (CVL) was observed, which can be explained by environmental factors and the diagnostic methods used. *TaqMan* qPCR proved to be more effective in detection throughout the study, compared to SYBR and conventional PCR. It is concluded that rapid and reliable diagnostic methods are extremely important for controlling and preventing CVL. Although in the present study *TaqMan* qPCR proved to be more effective and had a higher detection rate, both methods have their advantages and limitations, and the choice depends on the specific needs of each study.

Keywords: diagnosis, leishmaniasis, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania</i> sp.....	20
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Incidência de animais positivos para <i>L. infantum</i> , por TaqMan qPCR, em Cuiabá, Mato Grosso, no período de janeiro de 2021 a setembro de 2022.....	34
Gráfico 2 - Incidência e Taxa de Detecção de <i>L. infantum</i> , no ano de 2021....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de animais positivos para <i>L. infantum</i> em Cuiabá, Mato Grosso, no período de jan. 2021 a set. 2022.....	33
Tabela 2 - Número de animais detectados positivos para <i>L. infantum</i> conforme as diferentes técnicas.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bpm	Batimentos por Minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FAVET	Faculdade de Medicina Veterinária
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
mpm	Movimentos por minuto
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real
RIFI	Reação de imunofluorescência Indireta
RL	Ringer Lactato
SNC	Sistema Nervoso Central
TPC	Tempo de Perfusão Regional
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Histórico.....	18
2.2 Etiologia, Taxonomia e aspectos morfológicos da <i>Leishmania</i> sp.....	19
2.3 Transmissão.....	20
2.3.1 Vetores e Reservatórios	21
2.4 Doença e Formas Clínicas.....	22
2.4.1 Leishmaniose Visceral.....	23
2.5 Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	24
2.5.1 Transmissão e Ciclo Biológico na LVC.....	25
2.5.2 Aspectos Epidemiológicos da LVC no Estado de Mato Grosso.....	25
2.5.3 Características Clínicas da Leishmaniose Visceral em Cães.....	26
2.5.4 Métodos de Diagnóstico da LVC.....	27
2.5.5 Prevenção e Controle da LVC.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostras.....	31
4.2 Análises Moleculares.....	31
4.3 Análises Estatísticas.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Detecção de <i>L. infantum</i>.....	33
5.2 Sequenciamento Genético.....	35
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE A- ARTIGO OBJETO DA TESE.....	50

APÊNDICE B – ARTIGO SECUNDÁRIO.....	65
ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO DO PERIÓDICO.....	78
ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO ARTIGO.....	79
ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO OBJETO DA TESE	81
ANEXO D – COMPROVANTE DE ACEITE ARTIGO SECUNDÁRIO.....	82

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas de evolução crônica e zoonóticas, causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (HONIGBERG, 1963). São divididas de acordo com seu padrão de desenvolvimento no trato digestivo dos insetos flebotomíneos vetores em dois subgêneros: (*Viannia*) e (*Leishmania*). Vivem alternadamente sob forma amastigota em seu hospedeiro vertebrado (mamíferos) e sob forma promastigota nos insetos vetores (flebotomíneos), portanto, são parasitas com ciclo de vida heteroxênico (URQUHART et al., 1998; DANTAS-TORRES, 2007; COSTA et al., 2015, BRASIL, 2017).

É uma doença de relevância mundial, presente em quase 100 países, é considerada endêmica na África, Américas, Ásia e na Região do Mediterrâneo (WHO, 2022). Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas, que residem nessas áreas endêmicas, estejam expostas ao risco de infecção, com registro aproximado de 0,9 a 1,6 milhões de novos casos todos os anos e óbitos que chegam a cerca de 20.000 a 40.000 anualmente, sendo considerada uma das doenças parasitárias mais difundidas e negligenciadas (WHO, 2022). Nas Américas esse agente está presente em 18 países. No Brasil, no ano de 2017, 17.526 casos foram reportados, cerca de 72,6% do total de casos reportados nas Américas no mesmo ano (OPAS/OMS, 2020).

A doença pode se apresentar de diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro. As três principais formas de apresentação são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose Visceral (LV) (AKHOUNDI et al., 2016). Considerada a manifestação mais grave da doença, a LV invariavelmente acarreta óbito, em mais de 95% dos casos, se não tratada (GRAMICCIA e GRADONI, 2005; WHO, 2022). É caracterizada por febre ondulante, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia, e anemia. A LV é resultado da replicação das formas amastigotas nos fagócitos mononucleares do fígado, baço e medula óssea (BARRATT et al., 2010; BAÑULS et al., 2011).

Maior parte dos casos de LV ocorrem na Índia, África Ocidental e no Brasil. Anualmente, cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorrem ao redor do mundo, o que a torna uma das principais parasitoses com potencial de surto e

mortalidade. Em 2020, o Brasil encontrava-se entre os 10 países responsáveis por 90% dos novos casos notificados à OMS (WHO, 2022). No período de 2001-2017 dos 59.769 novos casos registrados nas Américas, 57.582, cerca de 96%, dos casos foram reportados no Brasil (OPAS/OMS, 2020). No Brasil é descrita em diversos municípios, apresentando mudanças importante no seu padrão de transmissão, sendo inicialmente predominantes em áreas silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. São registrados no país cerca de 3.500 novos casos por ano, com um coeficiente de incidência de 2 casos para cada 100 mil habitantes (MS-BRASIL, 2022). Na região do Centro Oeste, 90 novos casos em humanos, foram relatados em 2020, e desses, 12 provenientes do Estado de Mato Grosso (MS-BRASIL, 2022). Porém, assim como ocorre em todo o mundo, estima-se que apenas 25 a 45% dos casos são relatados (WHO, 2022), ou seja, esse número pode ser maior.

A LV é causada pela espécie *Leishmania (L) infantum chagasi* e esse agente tem como principal reservatório doméstico os cães, que é considerado o principal responsável pela manutenção desse agente na área urbana. Em alguns casos esses animais podem não desenvolver qualquer sinal clínico e são esses - animais assintomáticos - a principal fonte de infecção para o vetor - que vem ser o principal reservatório do parasito no ambiente e conseqüentemente para o homem, em áreas endêmicas para a doença.

O diagnóstico laboratorial se dá por métodos diretos como observação do parasito na lâmina por esfregaços ou impressão por aposição, cultura e reação em cadeia da polimerase e métodos indiretos por testes sorológicos (reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western Blot ou do teste cutâneo com antígenos de leishmania (reação de Montenegro) (BRASIL, 2017). Apesar da importância da doença, os métodos de diagnóstico apresentam algumas limitações. O método direto é trabalhoso e apresenta uma baixa sensibilidade, enquanto os exames sorológicos apresentam uma série de limitações, como por exemplo as reações cruzadas observadas outros tripanossomatídeos. (LAURENTI, 2009).

Em contrapartida, o diagnóstico molecular tem se mostrado um bom método de diagnóstico para a leishmaniose, permitindo diferenciar as espécies envolvidas, auxiliando assim no ponto de vista epidemiológico, e na escolha da abordagem terapêutica que será utilizada (MARCUSSE et al., 2008). Além disso, tem a vantagem

de alta sensibilidade na detecção e identificação das espécies de *Leishmania* spp. em diferentes amostras clínicas (NEITZKE-ABREU et al., 2013). Dentro dessas técnicas, a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR) tem se destacado, apresentando uma sensibilidade maior na detecção do parasito, permitindo detectar o DNA do agente mesmo em níveis muito baixos, quando comparado a *endpoint* PCR (PCR convencional) (HOSSAIN, 2017). Com base nisso, o presente estudo objetivou estimar a incidência da leishmaniose canina em amostras suspeitas na cidade de Cuiabá, MT bem como identificar e comparar diferentes protocolos para o diagnóstico de *L. infantum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Espécies semelhantes a *Leishmania* sp. já foram documentadas em tempos pré-históricos. Baseado nos dados disponíveis, acredita-se que os tripanossomatídeos tenham se originado em mamíferos do Mesozóico (KERR et al., 2000; HARKINS et al., 2016).

Na história antiga, apenas alguns relatos são encontrados da ocorrência de Leishmaniose em humanos. Lesões e feridas semelhantes são descritas desde o século VII a.C. (STEVERDING, 2017) e o DNA mitocondrial desses agentes já foram detectados em múmias egípcias encontradas em uma tumba do Império Médio em Tebas (ZINK et al., 2006).

A partir do século XVI são descritos diversos relatos de infecções de pele no Oriente médio que provavelmente correspondem a LC, e no mesmo período com a colonização das Américas surgiram relatos de condições faciais desfigurantes, relatados no caso de LMC, em conquistadores e missionários (COSTA et al., 2008). Quanto a LV, poucos relatos convincentes são encontrados antes do século XIX, sendo um dos primeiros relatos publicados por um cirurgião militar em 1827 (STEVERDING, 2017).

Em 1908, a espécie *L. infantum*, relacionada a LV foi descrita pela primeira vez pelo francês Charles Jules Henry Nicolle em crianças na Tunísia. Juntamente com Charles Comte, no mesmo ano, o parasita foi também encontrado em cães, e a partir daí, o cão tem sido apontado como hospedeiro com importante papel como reservatório (NICOLLE e COMTE, 1908).

No Brasil, o primeiro caso humano autóctone foi descrito por Migone em 1913, no Estado de Mato Grosso. E os primeiros estudos concretos nos Brasil, sobre a Leishmaniose, foram idealizados por Evandro Chagas, que demonstrou a existência da enfermidade em humanos e cães, bem como a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*.

O primeiro relato da zoonose no Estado de Mato Grosso, como descrito anteriormente, foi relatado pelo médico paraguaio Migone Mieres, que identificou a enfermidade em um trabalhador italiano que atuava na construção da Estrada de

Ferro Noroeste do Brasil. No entanto, os primeiros relatos de cães sorologicamente positivos no estado só foram relatados em 1997 e 1998, em áreas urbanas nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande, respectivamente (BENCHIMOL, 2020; MESTRE, 2007).

2.2 Etiologia, Taxonomia e aspectos morfológicos da *Leishmania* sp.

As *Leishmanias* sp. são espécies de protozoários da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, apresentam um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente sob forma aflagelada ou amastigota nos tecidos do seu hospedeiro vertebrado (mamíferos e reptéis no caso do subgênero *Sauroleishmania*) e sob forma flagelada ou promastigota no tubo digestivo dos insetos vetores (flebotomíneos) (URQUHART et al., 1998; DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2006; AKHOUNDI et al., 2016)

Em sua forma promastigota, demonstrada na Figura 1 (A) apresenta um formato fusiforme e tamanho variável, incluindo o flagelo de 1,5 a 3 µm de largura por 16 a 40 µm de comprimento. É extracelular, e seu flagelo normalmente tem tamanho igual ou maior que o corpo do parasito e se localiza na porção anterior, do mesmo. O núcleo oval ou arredondado e se encontra localizado na região mediana da célula e o cinetoplasto, uma organela citoplasmática com função e estrutura semelhante à uma mitocôndria, que fornece energia principalmente para a movimentação do flagelo, é localizado entre o núcleo e a extremidade anterior. (REY, 2008; TEIXEIRA et al., 2013; BENCHIMOL, 2020).

As amastigotas por sua vez, conforme mostrada na Figura 1 (B) são estruturas ovóides, intracelulares, que variam de tamanho de acordo com a espécie, medindo entre 1,5 a 3 µm por 3 a 6,5 µm de diâmetro. O núcleo ocupa aproximadamente um terço do corpo do parasito e o cinetoplasto se situa próximo a bolsa flagelar, onde um curto flagelo se encontra interiorizado. (REY, 2008; TEIXEIRA et al., 2013; BENCHIMOL, 2020).

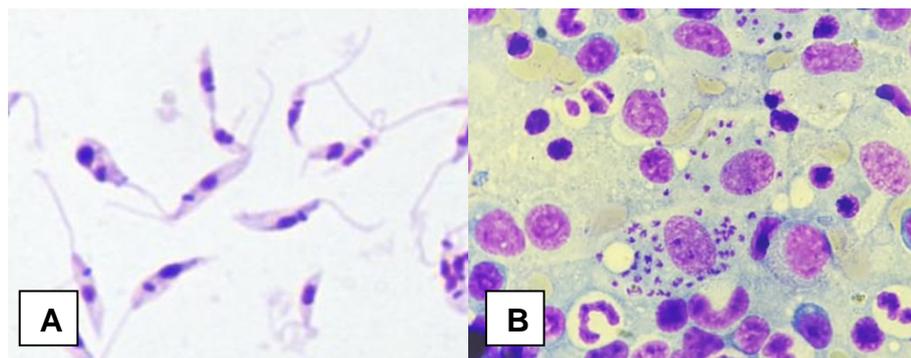


Figura 1: Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* sp. Fonte: (A) FIOCRUZ, 2022 e (B) PASSOS, 2023, respectivamente.

Atualmente o gênero *Leishmania* é subdividido em quatro subgêneros (*Leishmania*), (*Viannia*), (*Sauroleishmania*) e o subgênero estabelecido mais recentemente (*Mundinia*) que embora contenha espécies que infectem humanos, ainda permanece pouco estudado (BUTENKO *et al.*, 2019).

Em 1973 a *Sauroleishmania* foi descrito como um gênero separado pela primeira vez e mais tarde todas as espécies que infectam répteis foram separadas e classificadas como subgênero *Sauroleishmania*. É um grupo ainda negligenciado de parasitas e considerado até o momento não patogênico para mamíferos (TICHA *et al.*, 2021).

A identificação e diferenciação entre as espécies e subgêneros envolvidos na infecção em mamíferos é por vezes complexa, devido a grande semelhança morfológica entre os espécimes. Os subgêneros de maior importância, o *Leishmania* e o *Viannia* são diferenciados principalmente de acordo com seu padrão de desenvolvimento no trato digestivo dos insetos flebotomíneos vetores. Enquanto o subgênero *Leishmania* se desenvolve no intestino médio e anterior do flebotomíneo, as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo, na região do piloro, aderidos à parede (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; CALVOPIÑA *et al.*, 2023).

2.3 Transmissão

A transmissão das Leishmanioses se dá por meio de vetores dípteros da família

Psychodidae, subfamília Phebotominae, insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomia* (Novo Mundo) (MAROLI et al., 2013).

O ciclo biológico desses insetos, compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adultos (quando adquirem asas e quando ocorre a diferenciação entre machos e fêmeas) (FERREIRA, 2012). Esse ciclo dura em torno de 30 a 45 dias, mas pode variar dependendo da espécie em questão e das condições ambientais, tais como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. Em sua fase adulta medem cerca de 2 a 5 mm de comprimento e apresentam corpos revestidos de cerdas finas e longas, que lhe concedem aspecto hirsuto, apresentam patas alongadas e coloração amarelada, asas estreitas e sempre levantadas quando estão pousados (GÁLVEZ et al., 2018).

O Brasil é considerado um dos países que concentram maior número de espécies de flebotomíneos e as espécies comumente associadas a transmissão de Leishmanioses são a *Lutzomia longipalpes* (principal responsável pela transmissão da LV) e a *L. whitmani* [transmissão da Leishmaniose Tegumentar (LT)]. Popularmente no Brasil, esses insetos são conhecidos como “mosquito-palha”, “birigui”, “cangalha” ou “tatuquira” (CAVALCANTE et al., 2021).

Esses insetos dispõem de capacidade reduzida de voo, podendo voar por cerca de 400 m. Os adultos se concentram próximo a locais úmidos, com sombra e matéria orgânica, principalmente folhas e frutos, além de fezes de animais, que é onde as fêmeas colocam seus ovos. Por isso, eles também se encontram, muitas vezes, concentrados em áreas peridomiciliares como abrigos de animais domésticos, como o cão e em criações de galinhas e porcos. Durante o dia permanecem em seus abrigos, e têm seu pico de atividade no início da noite até a madrugada. Tanto machos como fêmeas se alimentam de seivas vegetais e pulgões, porém as fêmeas necessitam realizar o repasto sanguíneo, em animais e humanos, para a maturação de seus ovos, sendo assim, apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão das Leishmanioses (GÁLVEZ et al., 2018; TONELLI et al., 2021).

2.3.1 Vetores e Reservatórios da Leishmaniose

Os parasitos da *L. infantum* são transmitidos através da picada dos mosquitos flebotomíneos, sendo estes pertencentes a família Psychodidae, cuja principal

espécie envolvida na enfermidade é a *L longipalpis*, comumente conhecidos como mosquito palha. Há relatos que citam o díptero *Lutzomya cruzi* também como hospedeiro intermediário (MISSAWA e LIMA, 2006; COSTA e COSTA, 2014; BRASIL, 2017).

Há ainda as formas de transmissão vertical, venérea e transfusão sanguínea, que também são relatadas na literatura, porém, o papel epidemiológico destas formas ainda não é bem elucidado (TURCHETTI et al., 2014).

Diversas espécies animais podem se tornar reservatório da *L. infantum*, como por exemplo, animais silvestres (gambá, roedores e canídeos) e cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) (DANTAS-TORRES, 2007; COSTA, 2008; BENCHIMOL, 2020).

A grande susceptibilidade ao parasito e ao vetor, além de elevado parasitismo cutâneo com consequente aumento da capacidade de transmissão, fazem com que o *Canis lúpus familiaris*, seja considerado o principal reservatório doméstico. E o cão por ter proximidade com habitações humanas favorece a manutenção da infecção nos centros urbanos (BEVILACQUA et al., 2001; DANTAS-TORRES, 2007; GRAMICCIA, 2011).

2.4 Doença e Formas Clínicas

A leishmaniose é uma zoonose, infecciosa, não contagiosa e que apresenta um grande espectro de manifestações, que vão depender da espécie envolvida, sendo elas: LC, LMC e LV (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Nas Américas, 11 espécies de *Leishmania* são descritas como dermatrópicas causando doença em humanos, enquanto 8 espécies são exclusivas de animais. No Brasil, sete espécies de *Leishmania* estão envolvidas com os quadros de LC, as três principais são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e a *L. (L.) amazonenses*. As outras 4 espécies: *L. (V.) laisoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram recentemente identificadas em alguns estados do Norte e Nordeste do país (LAISON, 2010).

Apresentando-se de forma endêmica, no Brasil e em muitos outros países subdesenvolvidos, a leishmaniose em sua forma cutânea constitui um problema de

saúde pública (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Em humanos as lesões são exclusivamente cutâneas, únicas ou em pequeno número e tendem a cicatrização. As lesões formadas têm características semelhantes, tanto em animais quanto em humanos. São caracterizadas por úlceras indolores, com formato arredondado, medindo milímetros a alguns centímetros, bordas bem delimitadas, fundo avermelhado com granulações grosseiras e base eritomatosa, infiltrada e de consistência firme. Em humanos aparecem geralmente em áreas expostas da pele, enquanto nos animais, geralmente aparecem em focinhos, orelhas e escroto (BRASIL, 2006; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

Em casos mais raros, a LC pode-se apresentar de forma disseminada, observada em apenas 2% dos casos. Duas espécies são descritas como causadoras dessa síndrome: a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis*. Nesses casos, há o aparecimento de diversas lesões papulares com coloração avermelhadas, com centro contendo secreções, semelhantes a acne, acometendo vários segmentos corporais, frequentemente tronco e face (BRASIL, 2006).

A LCM é caracterizada por lesões destrutivas principalmente em mucosas das vias aéreas superiores, e em casos raros mucosas de órgãos genitais e anus e conjuntivas oculares. É importante ressaltar que esse quadro é secundário a LC, estima-se que apenas 3 a 5% dos casos de LC evoluam para esse quadro. Pode se apresentar de forma localizada ou difusa, acometendo as estruturas da pele e cartilaginosas da nasofaringe (BASANO e CAMARGO, 2004).

2.4.1 Leishmaniose Visceral

Zoonose de grande importância mundial é uma das doenças parasitárias mais difundidas e negligenciadas, estimando-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de 2 milhões de novos casos (WHO, 2010). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA, 1989) e ocorrendo em todo o território nacional tanto em sua forma visceral, quanto cutânea e mucocutânea (PÉREZ-AYALA et al., 2009).

Considerada a manifestação mais grave da doença, a Leishmaniose Visceral (LV) invariavelmente leva ao óbito sem tratamento (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Caracterizada por febre ondulante, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, principalmente anemia, a LV é resultado da replicação das formas amastigotas nos fagócitos mononucleares do fígado, baço e medula óssea (BARRATT et al., 2010; BAÑULS et al., 2011). Atualmente atinge 20 estados brasileiros, com média anual de 3.095 casos no período de 1996 a 2005 e incidência de 2,1 casos por 100.000 habitantes (ALVES, 2009).

2.5 Leishmaniose Visceral Canina

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose parasitária de grande importância na saúde pública, e está difundida em quatro importantes regiões ecoepidemiológicas, tais como: Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático (PAHO, 2022).

A espécie *L. donovani* é observada com maior ocorrência na África Oriental e na Índia, enquanto a *L. infantum* é conhecida como a causadora da leishmaniose visceral nas Américas (SOUSA et al., 2019; BRASIL, 2010;).

No Brasil há diversos estudos sobre a distribuição da leishmaniose visceral canina (LVC) e sua importância relacionada com o aumento da prevalência e incidência em áreas endêmicas e não endêmicas. Trata-se de estudos que ressaltam como as transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização explicam por que uma enfermidade antes restrita ao meio rural, passou a ocorrer com maior frequência em centros urbanos (MILIES et al., 1999; SAVANI et al., 2003; ALVES e BEVILACQUA, 2004).

A ocupação desordenada em meio urbano resultou em condições insalubres e precárias de vida, além da destruição e poluição ambiental, sendo estes fatores importantes para a emergência da enfermidade em polos urbanos (COSTA, 2008; DANTAS-TORRES et al., 2012).

O vetor *L. longipalpis* se adequa facilmente às condições peridomésticas, principalmente se há acúmulo de matéria orgânica no local e condições sanitárias precárias. Em contrapartida, cães não domiciliados que vagam pela periferia da cidade, podem se infectar quando entram em contato com reservatórios silvestres, sendo raposas, cachorros-do-mato e gambás, os principais reservatórios, e

posteriormente, retornar para o interior da cidade, servindo como fonte de infecção para outros animais e humanos (OLIVEIRA et al., 2001; COSTA, 2008; DANTAS-TORRES et al., 2012; PAHO, 2022).

Cães que vivem em áreas endêmicas podem apresentar ou não os sinais clínicos da doença, sendo que estas características são amplamente argumentadas quanto à constituição e importância desses animais como fonte de infecção para os flebotomíneos (GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2001; SILVA, 2005).

2.5.1 Transmissão e Ciclo biológico na Leishmaniose Visceral Canina

A transmissão da LVC envolve interações entre o parasito, vetor e hospedeiro. Trata-se de uma zoonose metaxênica, pois o agente etiológico passa por transformações no organismo do vetor. A enfermidade se inicia quando ocorre a inoculação da forma infectante do parasita (promastigota) e o seu desenvolvimento extracelular no organismo da fêmea adulta do flebotomíneo, e durante o repasto sanguíneo, ocorre a inoculação do agente no hospedeiro. Há relatos de que pode haver transmissões durante a transfusão sanguínea, porém este ainda não é bem elucidado (DANTAS-TORRES et al., 2012; MONTALVO et al., 2012).

Um estudo conduzido por DANTAS-TORRES et al. (2012) demonstra fatores que interferem na disseminação do parasito entre as populações caninas, sendo estes: sazonalidade, densidade populacional do vetor, densidade e susceptibilidade da população canina, grau de exposição dos cães aos vetores, e o hábito de adotar medidas preventivas pelos responsáveis, são fatores relevantes.

2.5.2 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral em Cães no Estado de Mato Grosso

Após os primeiros registros de cães soropositivos no estado, e considerando a importância da leishmaniose visceral na saúde pública, tornou-se inquestionável a necessidade de compreender a dinâmica da zoonose na região (MESTRE, 2007; ALMEIDA, 2009).

Um trabalho conduzido por Mestre (2007), a partir de inquéritos realizados em regiões urbanas e periurbanas de 49 municípios mato-grossenses, nos anos de 1998

a 2005, disponibilizados pela CVA/SES-MT, demonstrou que em 41 municípios (83,7%) tinham animais soropositivos para a doença. Dos 40.000 cães avaliados no estudo, estes representavam 9% de soropositividade para leishmaniose canina, sendo que o município de Jaciara foi o que obteve maior taxa de infecção, como 40%.

Entre os anos de 2003 e 2012 no município de Jaciara, os dados sorológicos que identificaram animais positivos para leishmaniose visceral canina, foram obtidos juntamente à agência de vigilância ambiental da Secretaria de estado de Saúde de Mato Grosso. O trabalho de Brito (2014) calculou o índice de positividade canina, pois diversos animais foram examinados por demanda espontânea, cujos responsáveis pelos animais procuraram o serviço de monitoramento ambiental quando os animais já se apresentavam enfermos. Tais identificações contiveram um total de 7.545 animais, dos quais 2.273 foram reagentes, resultando em elevados índices de positividade, cerca de 35,6%. No período de 2005 a 2012, houve um maior número de animais examinados, resultando na taxa média de positividade de 28,1%.

No município de Poxoréo, um estudo realizado por Azevedo (2008), demonstrou que a prevalência da doença nos cães era de 7,8%, e que esta prevalência já é relatada em diversas regiões endêmicas do Brasil. O estudo também relata que na região houve registros de casos humanos de leishmaniose visceral, e que medidas de controle da doença na região, foram: tratamento para humanos, identificação e eutanásia de animais positivos e controle vetorial.

Almeida (2009) realizou investigações na cidade de Cuiabá acerca de casos caninos de infecção por *Leishmania* sp. utilizando diagnóstico sorológico e citologia no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2008, dando enfoque a sua distribuição geográfica e correlacionando a ocorrência de casos de leishmaniose visceral humana. A amostragem foi de 150 animais com suspeita da infecção, sendo que 37,3% desses apresentaram resultados positivos nos exames realizados.

2.5.3 Características Clínicas da Leishmaniose Visceral em Cães

Por se tratar de uma doença de caráter crônico, os animais acometidos pela leishmaniose visceral canina podem apresentar sinais clínicos de 3 meses a 7 anos após a infecção. As características clínicas mais observadas são: polifagia, polidipsia,

perda de peso progressivo, epistaxe, vômito, onicogribose, mucosas pálidas, uveíte e conjuntivite (ALVAR et al., 2004; SALZO, 2008; FERNÁNDEZ-COTRINA et al., 2012).

Quando se observa alterações dermatológicas, principalmente dermatite esfoliativa com escamas esbranquiçadas, sem outros sinais clínicos aparentes, considera-se o animal como portador de envolvimento visceral, tendo em vista que os parasitas se disseminam por todo o organismo antes do desenvolvimento das lesões cutâneas (FEITOSA, 2000; ALVAR et al., 2004).

A dermatite esfoliativa com escamas esbranquiçadas pode ser generalizada, porém é mais pronunciada na cabeça, orelha e extremidades. Nota-se também em animais enfermos desenvolvem hiperqueratose naso-digital, áreas de alopecia, nódulos, pústulas e úlceras por todo corpo (FEITOSA, 2000; LINHARES et al., 2005).

Além disso, a LVC pode acarretar diversas alterações hematológicas, sendo a linfocitose e hiperglobulinemia duas das manifestações que podem ocorrer devido à resposta sistema imune do organismo ao parasito. E em resposta à essas alterações podem ser observadas também linfadenomegalia e esplenomegalia (FEITOSA et al., 2000; SALZO, 2008).

2.5.4 Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico da LVC baseia-se principalmente na avaliação dos sinais clínicos, achados laboratoriais e testes diagnósticos (NUNES et al., 2018). No entanto, o diagnóstico definitivo geralmente depende da detecção direta do parasita *L. infantum* em tecidos afetados do cão, como medula óssea, pele ou linfonodos, através de técnicas como a citologia (exame microscópico de amostras de tecido) e a cultura de parasitas, que são as técnicas consideradas “padrão ouro” (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; NUNES et al., 2018). Esses métodos permitem a visualização direta do parasita, fornecendo uma confirmação definitiva da infecção.

O exame direto se dá pela detecção direta do protozoário em amostras de punção aspirativa de medula óssea e linfonodos ou amostras de pele, por meio de citologia ou histopatológico, onde se busca observar a presença de amastigotas de *Leishmania* sp. É um método com alta especificidade, porém com sensibilidade variável (OLIVEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2020).

A cultura do parasito a partir de amostras de tecido envolve o crescimento do

agente em meios de cultivo em meios específicos, permitindo assim, a identificação da *Leishmania* sp. Apesar de ser um método de diagnóstico de alta especificidade, é uma técnica menos sensível comparada a outros métodos e demanda mais tempo e recursos específicos, tornando-se um meio mais complexo e limitando sua aplicabilidade em alguns casos (CASTELLI et al., 2014; REIMÃO et al., 2020).

Técnicas sorológicas, como o teste de aglutinação direta, RIFI e o ELISA são testes que apresentam uma taxa alta de sensibilidade, porém não é incomum apresentar resultados falso positivos em áreas endêmicas, por isso muitas vezes é utilizado como método de triagem (PEIXOTO et al., 2015; ZANETTE et al., 2014).

Embora não seja tradicionalmente considerada um método de diagnóstico “padrão ouro”, a PCR tem cada vez mais se tornado um método considerado de referência no diagnóstico de *Leishmania* sp. e de outros agentes, devido à sua alta sensibilidade e alta especificidade. É uma técnica que permite detectar o DNA do parasito em uma variedade de amostras, como sangue, tecido, medula óssea, linfonodos e amostras de pele e outros tecidos. Dentro dessa técnica, a qPCR se destaca por permitir identificar esse DNA, mesmo em casos em que há baixa carga parasitária, tornando essa técnica, uma ferramenta poderosa para o diagnóstico de LVC e complementando os métodos diretos de detecção do parasito (NUNES et al., 2018).

É importante ressaltar, que cada um desses métodos tem suas vantagens e limitações, e a determinação do melhor teste a se utilizar, vai depender de uma série de fatores, como fase da doença, tempo necessário e a disponibilidade de recursos. Em muitos casos a combinação de uma ou mais técnicas juntamente com a avaliação dos sintomas clínicos pode ser a maneira mais eficaz para diagnosticar a LVC com precisão (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.5.5 Prevenção e Controle da Leishmaniose Visceral Canina

Adotar medidas de prevenção para a LVC são formas cruciais não apenas de proteger a saúde dos cães, mas também de reduzir a transmissão aos seres humanos. Para uma prevenção eficaz, estratégias e medidas devem ser tomadas em conjunto, que incluem controle vetorial, vacinação, cuidado com o ambiente e cuidados preventivos para cães e pessoas (BANETH et al., 2008; TRAVI et al., 2018; DANTAS-

TORRES et al., 2019).

O controle vetorial, buscando uma redução da população de flebotomíneos é uma estratégia chave, que pode ser alcançado por meio do uso de repelentes. Focando nos cães, as coleiras impregnadas com inseticidas, contendo deltametrina entre outros piretróides, têm se mostrado uma forma bem eficaz de repelir os flebotomíneos e assim prevenir a infecção por *Leishmania* sp. nesses animais (BANETH et al., 2008; OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Outro método já presente no mercado, são as vacinações contra a LVC, que têm se mostrado uma estratégia promissora na redução da incidência da doença. Já existem no mercado vacinas com eficácia comprovada e que estimulam a imunidade contra o parasito, reduzindo assim a probabilidade de infecção após a exposição (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Como os flebotomíneos para se reproduzirem dependem da presença de matéria orgânica, o cuidado com o ambiente também contribui e muito para a redução desses insetos e por consequência, contribuem para a prevenção da LVC. A limpeza regular das áreas onde os animais passam a maior parte do tempo, limpeza da vegetação densa e eliminação de matéria orgânica, onde os flebótomos se reproduzem podem ser citadas como medidas para o controle desse agente (OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo objetivou estimar a incidência da leishmaniose canina em amostras de cães suspeitos de infecção submetidos ao diagnóstico molecular (qPCR), identificar a espécie envolvida na infecção e comparar diferentes protocolos para o diagnóstico de *L. infantum*.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Detectar a presença de DNA de *L. infantum* em amostras cedidas por laboratório privado em Cuiabá, MT.
- II. Estimar a incidência da infecção nas amostras recebidas para diagnóstico entre os anos de 2021 e 2022.
- III. Avaliar o uso de diferentes protocolos no diagnóstico da leishmaniose.
- IV. Sequenciar as amostras positivas e identificar a espécie envolvida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Entre Janeiro de 2021 e Setembro de 2022, amostras de sangue total em EDTA de 896 cães provenientes de diferentes clínicas e hospitais veterinários de Cuiabá, Mato Grosso, foram submetidas ao diagnóstico molecular de leishmaniose canina. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UFMT sob o número 23108.091966/2022-69.

4.2 Análises Moleculares

As amostras de sangue foram processadas para extração de DNA genômico por meio do Magmax Core Nucleic Acid Purification Kit (Applied biosystems, Austin TX, USA). Os produtos extraídos foram quantificados em Nanodrop lite (Thermo Scientific, Wilmington DE, USA).

As amostras de DNA foram processadas inicialmente por *TaqMan* qPCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG - 3') e LEISH-2 (5' - ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e sonda *TaqMan-MGB* (FAM-5' - AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' - supressor não fluorescente-MGB) conforme protocolo descrito por Francino et al. (2006). Este protocolo detecta o Kinetoplasto de *Leishmania* spp.

As amostras positivas pela *TaqMan* qPCR foram avaliadas em reações de *Sybr* qPCR e *endPoint* PCR por meio dos oligonucleotídeos iniciadores *CatLeishF* (5'-GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG-3') e *CatLeishR* (5'-CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC-3') descritos por Silva et al. (2019). Este protocolo amplifica parcialmente o gene da proteína catepsina, e é específico para *L. infantum*. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, Califórnia) e visualizados em um sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hércules, Califórnia), usando o software ImageLab™.

Com intuito de identificar a espécie de leishmania envolvida na infecção, amostra de 7 cães positivos na qPCR *TaqMan*, porém negativas nas outras reações foram aplicadas em nova reação de *endpoint* PCR pra fins de sequenciamento de nucleotídeos. Para esta caracterização, foram utilizados *primers* LGITSF2 (GCATGCCATATTCTCAGTGTC) e LGITSR2 (GGCCAACGCGAAGTTGAATTC) que amplificam uma região de 370 a 450 pares de bases do gene ITS2 conforme Almeida et al. (2011). A caracterização foi realizada por purificação e sequenciamento. Os produtos de tamanho esperado foram purificados usando o Kit de Purificação de Banda de DNA e Gel de PCR Illustra GFX (GE Healthcare, Chicago, Illinois) e preparados para sequenciação com kit BigDye™ (Applied Biosystems, Foster, Califórnia). Foi utilizado um Analisador Genético ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) para procedimentos de sequenciamento com os mesmos iniciadores utilizados para ensaios de PCR. As sequências obtidas foram então submetidas a uma análise da Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básica (BLAST) (ALTSCHULI et al., 1990) para determinar as identidades mais próximas com organismos congêneres disponíveis no GenBan.

4.3 Análise Estatística

A incidência da infecção por *Leishmania infantum* foi estimada conforme Le Rutte et al. (2021). Para o cálculo de incidência utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\text{Incidência} = \frac{\text{Número de indivíduos infectados}}{\text{Número de indivíduos testados}} \times 10^3$$

A análise descritiva foi realizada com auxílio dos softwares Excell e EpiInfo 7.0 para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de *L. infantum*

Foram avaliadas 896 amostras de sangue encaminhadas para diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. num período de 21 meses, na cidade de Cuiabá, MT. O número de amostras testadas por mês variou de 14 a 75, com média de 42 amostras por mês.

Os resultados obtidos por meios da reação de *TaqMan* qPCR estão demonstrados na Tabela 1.

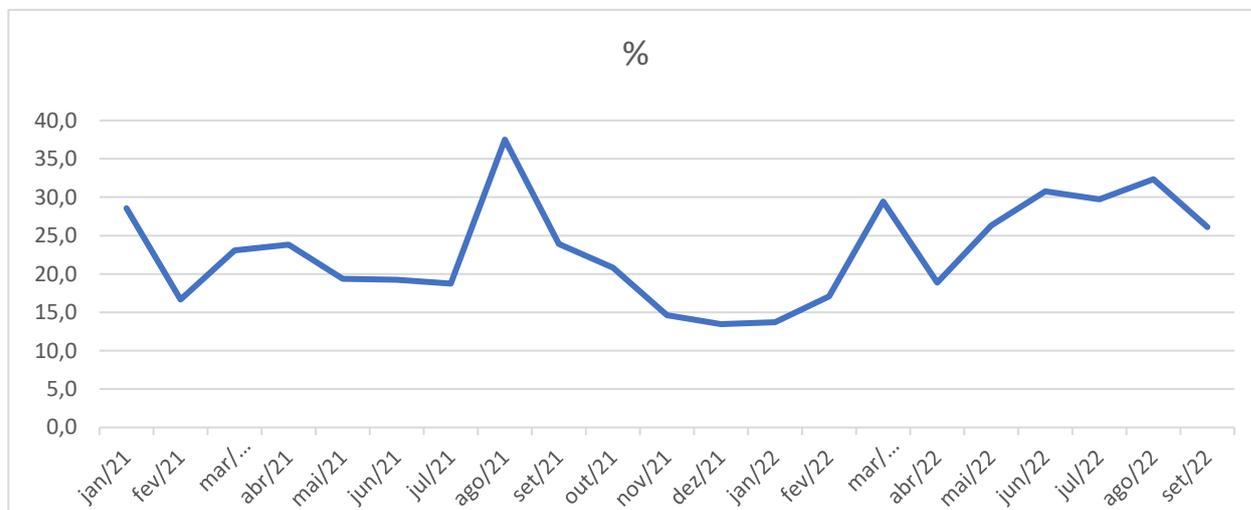
Tabela 1. Frequência de animais positivos para *L. infantum* em Cuiabá, Mato Grosso, no período de jan. 2021 a set. 2022.

	Nº	%
Positivos	210	23,44
Negativos	686	76,56
TOTAL	896	100

Fonte: Autores.

Foram detectados 210 (23,44%) amostras positivas pela reação *TaqMan* qPCR (Tabela 1). A incidência de cães detectados com DNA de *Leishmania* sp., por essa técnica variou de 13,5% a 32,4% (Gráfico 1). A taxa de incidência da leishmaniose entre 2021 e 2022 foi de 0,23 casos por mês. A densidade de incidência foi ajustada para 234 casos a cada 1.000 cães por mês.

Gráfico 1. Incidência de animais positivos para *Leishmania* spp., por *TaqMan* qPCR, em Cuiabá, Mato Grosso, no período de janeiro de 2021 a setembro de 2022.



Fonte: Autores.

Das amostras positivas pela qPCR *TaqMan*, 134 foram confirmadas pela reação de qPCR utilizando como alvo o gene da catepsina de *L. infantum*. E quando este protocolo foi avaliado em reação *endpoint*PCR foram observadas 114 amostras positivas, apresentando bandas de 223 pares de bases (Tabela 2).

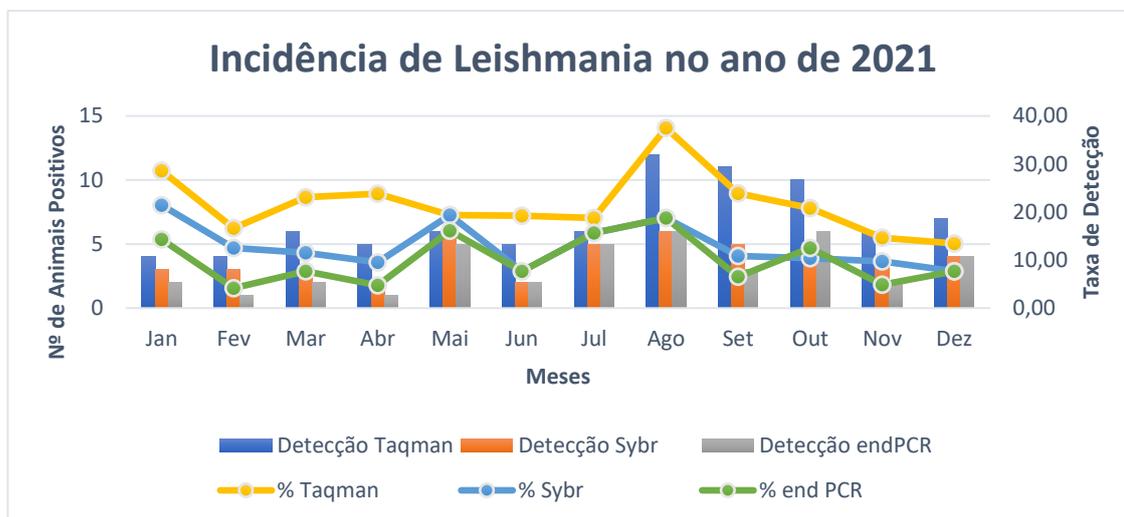
Tabela 2. Número de animais detectados positivos para *L. infantum* conforme as diferentes técnicas.

	<i>TaqMan</i>	<i>Syber</i>	<i>Endpoint</i> PCR
Animais positivos	210	134	114
Animais Negativos	686	76	96
TOTAL	896	210	210

Fonte: Autores.

Com intuito de observar o comportamento da amplificação do gene da catpsina nos cães *TaqMan* positivos, a incidência da infecção por *L. infantum* está apresentada No gráfico 2.

Gráfico 2. Incidência e Taxa de Detecção de *L. infantum*, no ano de 2021.



Fonte: Autores

5.2 Sequenciamento Genético

A amplificação do gene ITS2 de sete cães resultou em sequencias de 385 nucleotídeos. Todas as sequencias foram idênticas entre si e com 100% de similaridade com diferentes isolados de *L. infantum* no GenBank. A sequência consensual das sete amostras foi depositada no GenBank sob o número de acesso PP740848.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho estimou a incidência de *L. infatum* em cães suspeitos de infecção submetidos ao diagnóstico molecular. Não foi objetivo neste estudo de estimar a prevalência da infecção na população canina de Cuiabá, uma vez que o cálculo de amostragem não abrangeu a totalidade de cães da cidade, tampouco adotou modelo de amostragem sistemática. O banco de amostras foi construído por conveniência, mas reflete a situação do que ocorreu na cidade durante 21 meses consecutivos.

A frequência de cães positivos para *Leishmania* spp. foi calculada em 23,4%. Valores de frequência de infecção por *Leishmania* em cães no Brasil são mais comumente estimados por resultados sorológicos (BRASIL et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019; MENEGATTI et al., 2020; NAKKLOUD et al., 2021; ZUQUE et al., 2022). Por isso, dados oriundos de inquéritos moleculares são mais escassos, embora venha crescendo nos últimos anos e se tornando mais comum. Conseqüentemente muitos resultados ainda são discordantes, pois não há um método ainda padronizado para todos os laboratórios utilizarem. Por exemplo, resultados de inquérito molecular de leishmania demonstraram valores de 59,2% em cães de Marabá, PA (CAMPOLONGO et al., 2022), 84,7% em Campo Grande, MS (SILVEIRA et al., 2018) e 30% em Itaúna, MG (LOPES et al., 2020). Inclusive deve ser considerado que os diferentes estudos também utilizaram amostras de diferentes métodos amostrais, o que torna esta comparação ainda mais desafiante. O presente estudo utilizou amostras de cães com sintomas (suspeitos) provenientes de Clínicas e Hospitais Veterinários na área de Cuiabá, características estas que pode ter aumentado as chances de obter resultado positivo. Estudos anteriores demonstraram uma taxa de prevalência variável no de LVC na cidade de Cuiabá. Pesquisas anteriores em Cuiabá envolvendo 430 cães testados aleatoriamente por imunofluorescência identificaram uma soroprevalência de 22,1% (ALMEIDA et al., 2012), número que embora se assemelhe aos do presente estudo foram estimados com base em exames sorológicos.

Além desses, amostras de cães de comunidades ribeirinhas de Várzea Grande, Santo Antônio do Leverger e Cuiabá, diagnosticadas via PCR, mostraram uma prevalência média de 9,7%, com Cuiabá registrando 0% (SOUSA et al., 2019).

Essas variações nas taxas de incidência podem ser atribuídas às diferenças nos ecossistemas estudados e nos métodos de diagnóstico, sendo a qPCR notadamente mais sensível que métodos sorológicos e PCR convencional. Além disso, estudos como os de Fujimori et al. (2016) e Sousa et al. (2019) indicaram que cães infectados e sintomáticos são mais facilmente diagnosticáveis, semelhante às amostras examinadas neste estudo.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma preocupação significativa em Cuiabá e outras partes do Brasil, especialmente devido às condições ambientais favoráveis para o vetor da doença, o mosquito palha, e a alta presença de cães infectados que facilitam a continuação do ciclo de transmissão.

A taxa de incidência apresentou elevado valor, e deve ser considerado que representa as amostras recebidas em laboratório de análise molecular durante 18 meses. A densidade da incidência considerando a população de 1.000 cães foi estimada em 234 casos, valor muito superior ao relatado em outras literaturas (AZEVEDO et al., 2008; BORGES et al., 2014; CAMPOS et al., 2017; LE-RUTE et al., 2021). Como ressaltado anteriormente, este valor não deve ser considerado para a população canina da região, pois consideramos que são amostras oriundas de cães suspeitos, e por isso a chance de resultado positivo é maior.

As amostras positivas na qPCR *TaqMan* foram testadas por PCR para amplificar fragmento específico do gene da catepsina de *Leishmania infantum*. A reação foi padronizada em formato de *endpoint*PCR (SILVA et al., 2019), porém neste estudo optamos por aplicar também o método de qPCR utilizando o corante intercalador de DNA *Sybr*[®] *Green*. Segundo Silva et al. (2019), o fragmento amplificado é específico para *L. infantum*, e dessa forma com a confirmação dos positivos, pode-se inferir que as reações positivas na qPCR *TaqMan* seria associado a esta espécie. No entanto, das 210 positivas, apenas 134 e 114 confirmaram na qPCR *Sybr Green* e *endpoint*PCR.

Diante deste resultado, 10 amostras foram escolhidas para amplificação do gene ITS23 de leishmania, a fim de determinar a espécie envolvida na detecção. Das 10, sete amostras apresentaram resultado satisfatório e foram sequenciadas. O resultado desta análise demonstrou que as amostras discrepantes entre os diferentes métodos, se tratava de *L. infantum* (Genbank PP740848).

O presente estudo não objetivou comparar os métodos de *qPCR*, *TaqMan*, *Sybr Green* e *endpointPCR*, mas sim, utilizá-los para confirmar a espécie de leishmania envolvida na infecção dos casos. No entanto, perante os resultados observados na Tabela 2, observou-se que a reação *Sybr Green* confirmou 63,8% dos positivos no *TaqMan*, sugerindo menor sensibilidade. A primeira hipótese é de que as amostras não confirmadas seriam associadas a outra espécie que não *L. infantum*, pois o protocolo *TaqMan* utilizado neste estudo (Francino et al., 2006) detecta outras espécies de leishmania. Esta hipótese foi descartada com o sequenciamento de *L. infantum* em 7 amostras. A segunda hipótese estaria relacionada a menor sensibilidade do *qPCR Sybr Green* comparado ao *TaqMan*.

Tanto o *TaqMan* quanto o *Sybr Green* são químicos usados na *qPCR*, cada um com vantagens e desvantagens. A *TaqMan* utiliza sondas fluorogênicas específicas para o gene alvo, enquanto o *SYBR Green*, um corante que se liga ao DNA de cadeia dupla, é geralmente menos específico, pois pode se ligar a qualquer DNA de cadeia dupla, incluindo produtos de *PCR* não-específicos (REZAEI-RAD et al., 2014). O *SYBR Green* é frequentemente escolhido por ser mais econômico, já que não requer a síntese de sondas específicas (PEREIRA et al., 2014).

A eficácia da *TaqMan* foi confirmada em outros estudos para o diagnóstico de *Leishmania* spp. (FILGUEIRA et al., 2020) e de outros agentes (REZAEI-RAD et al., 2014), embora Silva et al. (2013) tenham encontrado resultados praticamente idênticos ao comparar as duas técnicas, incluindo na quantificação de carga parasitária. Em contraste, alguns estudos, como o de Gomes et al. (2017), indicaram uma maior sensibilidade do *SYBR Green* em comparação ao *TaqMan*.

Deve-se ressaltar que Francino et al. (2006) durante a padronização do método, calculou a sensibilidade analítica da reação por meio de curva comparativa de *Ct*. Por outro lado, não há dados publicados sobre o limiar de detecção da amplificação do gene da catepsina pelo método *Sybr Green*. Por isso devemos evitar tal comparação, tornando este um fator limitante do presente estudo.

Contudo, a literatura sugere que ambos os métodos de *qPCR* são confiáveis para detectar a infecção por *Leishmania* sp. (PERIS et al., 2021), e a escolha do método deve considerar as vantagens e desvantagens de cada um, bem como as condições específicas do estudo.

7 CONCLUSÃO

A incidência da infecção canina por *L. infantum* em amostras suspeitas enviadas para diagnóstico molecular na cidade de Cuiabá foi de 0,23 ao longo de 18 meses. Este valor significa que a cada 1000 cães suspeitos, 234 estiveram infectados pelo agente no período supracitado em Cuiabá, MT.

A espécie envolvida na detecção foi *L. infantum*, e o protocolo de qPCR *TaqMan* (que detecta o kinetoplasto de *Leishmania* spp.) apresentou-se mais apto ao diagnóstico da leishmaniose canina.

Apesar dos métodos de qPCR *Sybr Green* e *endpoint*PCR serem menos capazes de detectar o agente, é necessário que seja calculada o limiar de detecção destas reações para que seja confirmada a sensibilidade e especificidade de cada método.

A Leishmaniose Visceral representa uma zoonose significativa tanto para a saúde pública quanto veterinária, impactando não apenas cães, mas também seres humanos. Considerando que Cuiabá é uma área endêmica para essa doença, é fundamental encontrar métodos de diagnóstico rápidos e precisos para a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) visando seu controle e prevenção tanto em animais quanto em humanos.

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.B.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUH, M.A.A.; TURBINO N.C.M.R.; SOUSA, V.R.F. Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.156-9, 2009.
- ALMEIDA, B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da Leishmaniose Visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1610-1615, 2010.
- ALMEIDA, M.E.; STEURER, F.J.; KORU, O.; HERWALDT, B.L.; PIENIAZEK, N.J.; DA SILVA, A.J. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 3143–3149, 2011.
- ALVAR J.; CAÑAVATE C.; MOLINA R.; MORENO J.; NIETO J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, v. 57, p.1-88, 2004.
- ALVES, W.A. Leishmaniose Visceral Americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.71, p.25-29, 2009.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignmet Search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTYPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.6, p.1-40, 2016.
- AZEVEDO, M.Á.A.; DIAS, A.K.K.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.3, p.123-127, 2008.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P. FERRER, L. Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n.7, p.324-330, 2008.
- BAÑÜLS, A. L.; BASTIEN, P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.10, p.1451–1461, 2011.
- BARRATT, J.L.N.; HARKNESS, J.; MARRIOTT, D., ELLIS, J.T., STARK, D. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p.795-836, 2011.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

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

BENCHIMOL, J.L. **Leishmanioses do Novo Mundo numa perspectiva histórica e global, dos anos 1930 aos 1960**. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v.27, supl., set. 2020.

BEVILACQUA, P.D. Urbanização da Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.1 p.1-8, 2001.

BORGES, L.F.N.M.; LOPES, E.G.P.; A.C.P.; SILVA, M.X.; HADDAD, J.P.A.; SILVA, J.A.; NICOLINO, R.R.; SOARES, D.F.M. Prevalência e distribuição espacial de Leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n.2, p.352-357, 2014.

BRASIL, A.W.L.; MACHADO, D.M.R.; SILVA, M.A.R.X.; BARROSA, N.C.; SILVA, R.B.S.; MELO, M.A.; LANGONI, H.; SANTOS, C.S.A.B.; AZEVEDO, S.S. Prevalência e fatores de risco associados às infecções por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães atendidos em clínicas veterinárias de João Pessoa, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, n.5, p.2293-2299, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretária de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2017. 190p. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
>. Acesso em: 10 de set. de 2022.

BRITO, V. N.; OLIVEIRA, C. M.; LAZARI P.; SOUSA, V. R. F. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara, Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.1, p.63-68, 2014.

BUTENKO, A.; KOSTYGOV, A.; SÁDLOVÁ, J.; KLESCHENKO, Y.; BECVAR, T.; PODESVOVÁ, L.; MACEDO, D.H.; ZIHALA, D.; LUKES, J.; BATES, P.A.; OPPERDOES, F.R.; YURCHENKO, V. Comparative genomics of *Leishmania* (Mundinia). **BMC Genomics**, v. 20, n.726, p.1-12, 2019.

CALVOPIÑA, M.; FONSECA-CARRERA, D.; VILLACRÉS-GRANDA, I.; TOAPANTA, A.; CHILUISA-GUACHO, C.; BASTIDAS-CALDAS, C. New Primers for Detection and Differentiation between *Leishmania viannia* and *L. leishmania* Subgenera by Polymerase Chain Reaction. **Iran Journal of Parasitology**, v. 18, n.3, p.351-356, 2023.

CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G.; CUNHA, L.; MAGALHÃES, L.; MORAES, J.; RAMALHO, D.; LIMA, S.; PACHECO, J.A.; LIPSCOMB, M.; RIBEIRO DE JESUS, A.; PACHECO DE ALMEIDA, R. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v.12, n.1, p.67-73, 2017.

CAMPOLONGO, C.; SILVA, R.E.D.; AZEVEDO, R.C.F.E.; PESENATO, I.P.; CARIOCA, A.C.F.; ALVES, B.F.; CASTELLI, G.S.N.; ONOFRIO, V.V.; MARCILI, A. Prevalence of *Leishmania infantum* in Dogs from Deforested Areas of the Amazon Biome. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v.22, n.2, p.108-113, 2022.

CASTELLI, G.; GALANTE, A.; VERDE, V.; MIGLIAZZO, A.; REALE, S.; LUPO, T.; PRAÇA, M.; VITALE, F.; BRUNO, F. Evaluation of two Culture Media for *Leishmania infantum* cultivation versus different culture media. **Parasitology**, v. 100, n.2, p.228-230, 2014.

CAVALCANTE, K.S.; RODRIGUES-JR, J.; GAMA, G.S.; SANTOS, W.M.; GALARDO, A.K.R. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em uma área periurbana na cidade de Macapá, Amapá, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n.2, p.2417-2426, 2021.

COSTA C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.12, p.2959-2963, 2008.

COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F. (org.). **Leishmaniose do continente americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p. 327-353.

COSTA, A.P.; COSTA, F.B.; SOARES, H.S.; RAMÍREZ, D.G.; MESQUITA, E.T.K.C.; GENNARI, S.M.; MARCILI, A. Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum chagasi infection in wild mammals from Maranhão state, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.15, n.11, p.656-666, 2015.

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.; MIRÓ, G.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; BREITSCHWERDT, E.; CAPELLI, G.; CARDOSO, L.; MICHAEL, D.; DOBLER, G.; FERRER, L.; IRWIN, P.; JONGEJAN, F.; KEMPF, W.A.J.; KOHN, B.; LAPPIN, M.; PEQUENA, S.; MADDER, M.; MAGGI, R.; MAIA, K.; MARCONDES, M.; NAUCKE, T.; OLIVA, G.; PENNISI, M.G.; PENZHORN, B.L.; PEREGRINO, A.; PFEFFER, M.; ROURA, X.; SAINZ, A.; SHIN, S.S.; SOLANO-GALLEGO, L.; STRAUBINGER, R.K.; TASKER, S.; TRAUB, R.; WRIGHT, I.; BOWMAN, D.D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Canine Leishmaniasis control in context of the one health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n.12, p.1-4, 2019.

DANTAS-TORRES F.; SOLANO-GALLEGO L.; BANETH G.; ROBEIRO V. M.; de PAIVA-CAVALCANTI M.; OTRANTO D. Canine leishmaniosis in the Old and New

Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v.28, n.12, p.531-538, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, E.C.; DE MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.F. Leishmanioses do novo mundo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.9-27, 2012.

FILGUEIRA, C.P.B.; MOREIRA, O.C.; CANTANHÊDE, L.M.; FARIAS, H.M.T.; PORROZZI, R.; BRITTO, C.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E. Comparasion and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1-18, 2020.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay of diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

FUJIMORE, M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; DIAS, A.F.L.R.; RODRIGUES, J.Y.; NAKASATO, L.; MADEIRA, M.F.; SOUZA, V.R.F. Prevalence and Associated Factors of Canine Visceral Leishmaniasis in a Endemic Area od Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 4, p.1-4, 2016.

GÁLVEZ, R.; MONTAYA, A.; FONTAL, F.; MURGUÍA, L.M.; MIRÓ. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canina *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. **Research in Veterinary Science**, v. 121, p. 94-103, 2018.

GOMES, C.M.; CESETTI, M.V.; PAULA, N.A.; VERNAL, S.; GUOTA, G.; SAMPAIO, R.N.R.; ROSELINO, A.M. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR using Biopsy ans Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in a Area Where *Leishmania (viannia) braziliensis* is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.55, n.2, p.526-534, 2017.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.71-80, 2003.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 23-30, 2011.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1169 -1180, 2005.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4a ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2011.

GUARGA J.L.; LUCIENTES, J.; PERIBÁÑEZ, M.A.; MOLINA, R.; GRACIA, M.J.; CASTILLO, J.A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania* in dogs. **Acta Tropica**, v.77, p.203-207, 2000.

HARKINS, K.M.; SCHWARTZ, R.S.; CARTWRIGHT, R.A.; STONE, A.C. Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 38, p.101-109, 2016.

HONIGBERG, B.M. **A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates**. In: LUDVIK, J.; LOM, J.; VAVRA, J. editors. Progress in Protozoology. New York: Academic Press; 1963. p. 68–9.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p.439-445, 2006.

KERR, S.F.; MERKELZ, R.; MACKINNON, C. Further support for a Palaeartic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.579-581, 2000.

LAISON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n.2, p.13-32, 2010.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.67, p.13-23, 2009.

LE RUTTE, E.A.; WILT, L.S.; BULSTRA, C.A.; NIEBOER, D.; KONTOROUPI, P.; VLAS, S.J.; RICHARDUS, J.H. Incidence and geographical distribution of canine leishmaniosis in 2016-2017 in Spain and France. **Veterinary Parasitology: Regional and Studies Reports**, v.25, p.1-5, 2021.

LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LOPES, J.V.; MICHALSKY, É.M.; PEREIRA, N.C.L.; PAULA, A.J.V.; SOUZA, A.G.M.; PINHEIRO, L.C.; LIMA, A.C.V.M.D.R.; AVELAR, D.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; LANZETTA, V.A.S.; MELO, J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.53, p.1-19, 2020.

MARCUSSI, V.M.; MARCUSSI, L.M.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v.120, n.4, p.300-305, 2008.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.D.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, p.123-147, 2013.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 107, n.1, p.7-14, 2014.

MENEGATTI, J.A.; OLIVEIRA-JR, G.J, Silva, L.C.F.; OLIVEIRA, A.; BICA, D.L.C.; SANTOS, P.V.B.A. CUNHA-FIIHO, L.F.C.; LUNARDI, M. Fauna flebotomínica e soroprevalência para leishmaniose visceral canina em áreas urbana na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n.4, p.1197-1205, 2020.

MESTRE, G. L. C., FONTES C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.1, p.42-48, 2007.

MILIES M. A.; VEXENAT J. A.; CAMPOS J. H. F.; CASTRO J. H. F. **Canine leishmaniasis in Latin American: Control Strategies for Visceral Leishmaniasis**. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet; 1999. p. 46-53.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020**. 2022. Disponível em: < chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-casos.pdf>. Acesso em 14 de set. de 2022.

MISSAWA, N.; LIMA G.; Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p.337-340, 2006.

MONTALVO A. M.; FRAGA J.; MONZOTE L.; GARCÍA M.; FONSECA L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical y Parasitología**, v.64, n.2, p.108-131, 2012.

NAKKOUD, J.R.; FAVACHO, A.R.M.; SANTOS, C.M.; FERREIRA, E.C.; AQUINO, D.R.R.R.A. Prevalência de Leishmaniose Visceral em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Anhanguera- UNIDERP entre 2017 e 2019, Campo Grande – MS. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.9, p.86948-86963, 2021.

NEITZKE-ABREU, H.C.; VENZAZZI, M.S.; BERNAL, M.V.Z.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; VAGETTI, F.; MOTA, C.A.; SILVA, N.R.; ARISTIDES, S.M.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.7, p.1-7, 2013.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine Canine du kala-azar. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 1, p.299-301, 1908.

NUNES, J.B.; COURA-VITAL, W.; COLOMBO, F.A.; BAÊTA, F.J.M.; PINHEIRO, A.C.; ROATT, B.M.; REIS, L.E.S.; REIS, A.B.; MARQUES, M.J. Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 117, p.3341-3346, 2018.

OLIVEIRA, C.D.L., et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.1231-123, 2001.

OLIVEIRA, S.S.; CHIG, L.A.; SILVA, C.P.A.; CARVALHO, A.C.; MASSOLI-JÚNIOR, E.V.; CARVALHO, L.A.S. Survey of Leishmaniasis Vectors in the City of Cuiabá. **Uniciência**, v. 21, n.1, p.17-20, 2017.

OLIVEIRA, V.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES-Jr, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, F.B.; CAMPOS, M.P.; RODRIGUES, F.C.C.; OLIVEIRA, R.V.C.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MENEZES, R.C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dog: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLOS ONE**, v. 12, n.4, p.1-15, 2017.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) -OMS. **Informe Epidemiológico das Américas 2020**. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53091/OPASCDEVT200041_por.pdf?sequence=6&isAllowed=y>. Acesso em: 15 de set. de 2022.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends of Parasitology**, v. 29, n.7, p.339-345, 2013.

PEIXOTO, H.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; ROMERO, G.A.S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n.3, p.334-352, 2015.

PEREIRA, M.R.; ROCHA-SILVA, F.; GRACIELE-MELO, S.; LAFUENTE, C.R.; MAGALHÃES, T.; CALIGIORNE, R.B. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-4, 2014.

PÉREZ-AYALA, A.; NORMAN, F.; PÉREZ-MOLINA, J.A.; HERRERO, J.A.; MONGE, B.; LÓPES-VÉLEZ, R. Imported leishmaniasis: a heterogeneous group of diseases. **Journal of Travel Medicine**, v. 16, n. 6, p. 395–401, 2009.

PERIS, M.P.; ESTEBAN-GIL, A.; ORTEGA-HERNANDEZ, P.; MORAIS, M.; HALAIHEL, N.; CASTILLO, J.A. Comparative Study of Real-Time PCR (TaqMan Probe and Sybr Green), Serological Techniques (ELISA, IFA and DAT) and Clinical Signs Evaluation, for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Microorganisms**, v. 9, p.1-10, 2021.

REIMÃO, J.Q.; COSER, E.M.; RAN-LEE, M.; COELHO, A.C. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n.11, p.1-30, 2020.

REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª edição. RJ. Guanabara Koogan; 2008.

REZAEI-RAD, M.S.; SEPEHRIZADEH, Z.; MOTTAGHI-DASTJERDI, N.; YAZDI, M.T.; SEYATESH, N. Comparison of SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods for quantitative detection of residual CHO host-cell DNA in biopharmaceuticals. **Biologicals**, v. 43, n.2, p. 130-135, 2014.

RIBEIRO, C.R.; GONÇALVES, C.A.; CRUZ, L.M.; GALERA, P.D. Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal – Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, p.1-8, 2019.

SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. Nosso clínico: Troféu, São Paulo, v. 11, n. 63, p. 30-34, 2008.

SARAVIA, N.G.L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A.F.; HOLGUÍN, C.; NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.159, p.725-735, 1989.

SAVANI, E.S.M.M.; SCHIMONSKY, B.V.; CAMARGO, M.C.G.O.; D-AURIA, S.R.N. Surveillance of American Visceral Leishmaniasis in dogs from a non-endemic área, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.230-232, 2003.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p.324-328, 2005.

SILVA, A.V.M.; SOUZA, R.L.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES-FR, A.A.V.; FERREIRA, L.C.; FILGUEIRA, C.P.B.; CUERVO, P.; PORROZZI, R.; MENEZES, R.C.; MORGADO, F.N. Detection of amastigotes and histopathological alterations in the thymus of *Leishmania infantum* infected dogs. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 8, p.127-139, 2020.

SILVA, R.E.; SAMPAIO, B.M.; TONHOSOLO, R.; COSTA, A.P.; COSTA, L.E.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; SPERANÇA, M.A.; MARCILI, A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v.19, n.1, p.1-9, 2019.

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.

SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.S.S.; Andrade, S.M.; YOKOO, M.; RIBEIRO, M.L.; BARTCHEWSKY, W.; SOCORRO-SILVA, A.; CASTRO, J.A.F.; MONTE, S.J.H. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, n. 2, p.137-143, 2013.

SILVEIRA, A.P.S.D.; VIEIRA, V.B.D.; BATALINI, L.S.; CARMO, S.B.D.; FRIOZI, E.; ARRUDA, E.J.; LIMA JUNIOR, M.S.D.C.; NEITZKE-ABREU, H.C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n.6, p.843-847, 2018.

SOLANO-GALLEGO, A.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet Guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.4, n.86, p.1-16, 2011.

SOUSA, V.R.F.; DIAS, A.F.L.R.; RODRIGUES, J.Y; TORRES, M.M.; MOREIRA, J.M.A.R.; NAKASATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA, A.B.P.F. Canine visceral leishmaniasis in riverside communities of the Cuiabá river watershed. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n.6, p. 3313-3320, 2019.

STEVERDING, D. The history of Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n.82, p.1-10, 2017.

TEIXEIRA D. E.; BENCHIMOL M.; RODRIGUES J C.; CREPALDI P. H.; PIMENTA P. F.; SOUZA de W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLOS PHATOGENS**, v.9, n.10, p.1-4, 2013.

TICHA, L.; KYKALOVA, B.; SADLOVA, J.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; VOLF, P. Development of Various *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* Strains in Three *Phlebotomus* Species. **Microorganisms**, v. 9, n.11, p.1-13, 2021.

TONELLI, G.B.; BLINDER, C.; NOGUEIRA, V.L.C.; PRADO, M.H.; THEOBALDO, G.G.; CAMPOS, A.M.; SOUZA, C.M.; ANDRADE-FILHO, J.D. The sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the urban área of Lassance, Northeast Minas Gerais, Brazil. **PLOS ONE**, v. 16, n.10, p.1-12, 2021.

TRAVI, B.L.; SILVA, A.C.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. 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.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.119-24, 2001.

TURCHETTI, A. P.; SOUZA, T. D.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n.4, p.403-407, 2014.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p.190-192, 1998.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**. WHO Technical Report Series, n.949, 2010, 201p.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 13 de set. de 2022.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; VIEIRA, R.F.C.; Biondo, A.W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n.1, p.105/107, 2014.

ZINK, A.R.; SPIGELMAN, M.; SCHRAUT, B.; GREENBRATT, C.L.; NERLICH, A.G.; DONOGHUE, H.D. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1616-1617, 2006.

ZUQUE, M.A.S.; MANZINI, S.; BERTOZZO, T.V.; MARTIN, M.F.A.; PAIXÃO, M.S.; SANTOS, W.J. Ocorrência de *Leishmania* spp. em população canina domiciliada e humana de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul e análise espacial. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p.1-18, 2022.

Apêndice A – Artigo submetido para publicação.

Artigo submetido para publicação na Revista Observatório de la Economía Latinoamericana, classificada como A4 Qualis Capes, quadriênio 2017-2020.

Incidência da Infecção por *Leishmania infantum* em cães atendidos em clínicas e hospitais Veterinários da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 e 2022.

Incidence of *Leishmania infantum* Infection in dogs treated at Veterinary Clinics and Hospitals in the City of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, between 2021 and 2022

Sayanne Luns Hatum de Almeida¹; Priscila Juliana Stumer Gonçalves Mizuuti¹; Nathalia de Assis Pereira; Daniel Moura de Aguiar¹.

RESUMO

As Leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas de evolução crônica e zoonóticas de relevância mundial. O presente trabalho objetivou estimar a incidência da infecção por *Leishmania infantum* em cães oriundos de diferentes clínicas e hospitais veterinários de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 e 2022. O diagnóstico foi baseado na detecção molecular do agente, inicialmente por qPCR Taqman para detectar o kinetoplasto de *Leishmania* spp. seguida por testagem das amostras positivas por qPCR Sybr e *endpoint*PCR do gene da catepsina de *L. infantum*. Amostras que apresentaram disparidade entre as análises supracitadas foram testadas novamente com intuito de amplificar para fins de sequenciamento, o gene ITS de *Leishmania* spp. De 896 amostras testadas, 210 (23,44%) foram positivas para *L. infantum* pelo método qPCR Taqman. A incidência de cães detectados com DNA de *Leishmania* sp., variou de 13,5% a 32,4%. A taxa de incidência da leishmaniose entre 2021 e 2022 foi de 0,23 casos por mês. A densidade de incidência foi ajustada para 234 casos a cada 1.000 cães por mês. Das amostras positivas pela qPCR Taqman, 134 foram confirmadas pela reação de qPCR utilizando como alvo o gene da catepsina de *L. infantum*. E quando este protocolo foi avaliado em reação *endpoint*PCR foram observadas 114 amostras positivas, apresentando bandas de 223 pares de bases. Comparando com estudos anteriores na mesma região foi observada uma variação significativa nas taxas de prevalência de Leishmania Visceral Canina (LVC), que podem ser explicados por fatores ambientais e os métodos diagnósticos utilizados. A qPCR TaqMan mostrou-se mais eficaz na detecção durante todo o estudo, em comparação com o SYBR e a PCR convencional. Conclui-se que métodos

diagnósticos rápidos e confiáveis são de extrema importância para controle e prevenção da LVC. Apesar de no presente estudo a qPCR Taqman ter se mostrado mais eficaz e uma taxa de detecção maior, os dois métodos tem suas vantagens e limitações e a escolha depende nas necessidades específicas de cada estudo.

Palavras-chave: diagnóstico, leishmaniose, qPCR.

ABSTRACT

Leishmaniasis are chronic, zoonotic, non-contagious infectious diseases of global relevance. The present work aimed to estimate the incidence of *Leishmania infantum* infection in dogs from different clinics and veterinary hospitals in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, between 2021 and 2022. The diagnosis was based on the molecular detection of the agent, initially by Taqman qPCR to detect the kinetoplast of *Leishmania* spp. followed by testing of positive samples by Sybr qPCR and endpointPCR of the *L. infantum* cathepsin gene. Samples that showed disparity between the aforementioned analyzes were tested again with the aim of amplifying the ITS gene of *Leishmania* spp. for sequencing purposes. Of 896 samples tested, 210 (23.44%) were positive for *L. infantum* by the Taqman qPCR method. The incidence of dogs detected with *Leishmania* sp. DNA ranged from 13.5% to 32.4%. The incidence rate of leishmaniasis between 2021 and 2022 was 0.23 cases per month. The incidence density was adjusted to 234 cases per 1,000 dogs per month. Of the positive samples by Taqman qPCR, 134 were confirmed by the qPCR reaction using the *L. infantum* cathepsin gene as a target. And when this protocol was evaluated in the endpointPCR reaction, 114 positive samples were observed, presenting bands of 223 base pairs. Comparing with previous studies in the same region, a significant variation in the prevalence rates of Canine Visceral *Leishmania* (CVL) was observed, which can be explained by environmental factors and the diagnostic methods used. TaqMan qPCR proved to be more effective in detection throughout the study, compared to SYBR and conventional PCR. It is concluded that rapid and reliable diagnostic methods are extremely important for controlling and preventing CVL. Although in the present study Taqman qPCR proved to be more effective and had a higher detection rate, both methods have their advantages and limitations and the choice depends on the specific needs of each study.

Keywords: diagnosis, leishmaniasis, qPCR.

RESUMEN

Las leishmaniasis son enfermedades infecciosas crónicas, zoonóticas y no contagiosas de relevancia mundial. El presente trabajo tuvo como objetivo estimar la incidencia de infección por *Leishmania infantum* en perros de diferentes clínicas y hospitales veterinarios de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 y 2022. El diagnóstico se basó en la detección molecular del agente, inicialmente por Taqman qPCR para detectar el cinetoplasto de *Leishmania* spp. seguido de pruebas de muestras positivas mediante Sybr qPCR y PCR de punto final del gen de la catepsina de *L. infantum*. Las muestras que mostraron disparidad entre los análisis antes mencionados fueron analizadas nuevamente con el objetivo de amplificar el gen ITS de *Leishmania* spp. De 896 muestras analizadas, 210 (23,44%) fueron positivas para

L. infantum mediante el método Taqman qPCR. La incidencia de perros detectados con ADN de *Leishmania* sp osciló entre el 13,5% y el 32,4%. La tasa de incidencia de leishmaniasis entre 2021 y 2022 fue de 0,23 casos por mes. La densidad de incidencia se ajustó a 234 casos por 1.000 perros por mes. De las muestras positivas mediante Taqman qPCR, 134 fueron confirmadas mediante la reacción qPCR utilizando el gen de la catepsina de *L. infantum* como objetivo. Y cuando se evaluó este protocolo en la reacción endpointPCR, se observaron 114 muestras positivas, presentando bandas de 223 pares de bases. En comparación con estudios previos en la misma región, se observó una variación significativa en las tasas de prevalencia de *Leishmania* visceral canina (LVC), que puede explicarse por factores ambientales y los métodos de diagnóstico utilizados. TaqMan qPCR demostró ser más eficaz en la detección durante todo el estudio, en comparación con SYBR y la PCR convencional. Se concluye que los métodos de diagnóstico rápidos y confiables son de suma importancia para controlar y prevenir la CVL. Aunque en el presente estudio Taqman qPCR demostró ser más efectivo y tener una mayor tasa de detección, ambos métodos tienen sus ventajas y limitaciones y la elección depende de las necesidades específicas de cada estudio.

Palabras clave: diagnóstico, leishmaniasis, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

As Leishmaniose são zoonoses causada por protozoários do Gênero *Leishmania* sp. e transmitidas pela picada de flebotomíneos infectados conhecidos popularmente por Mosquitos-palha (URQUHART et al., 1998; DANTAS-TORRES, 2007). Dentre as formas de maior importância epidemiológica, a Leishmaniose Visceral (LV) é a que mais se destaca, sendo a mais comum e a mais grave (WHO, 2022; GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Nos animais os sintomas podem ser leves, com perda de apetite e letargia até sinais mais graves como emagrecimento progressivo, aumento do volume abdominal, causado por hepatomegalia e esplenomegalia, além de problemas renais, oculares, alopecia e lesões cutâneas. Além disso, alguns cães podem ser portadores assintomáticos da doença, tornando o diagnóstico e o controle da doença ainda mais desafiadores (CAMARGO et al., 2007; LAPPIN, 2010).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença endêmica em várias regiões no Brasil, causada pelo protozoário *L. infantum* (FERREIRA, et al., 2012). É considerada problema de saúde pública, pois cães desempenham importante papel na epidemiologia da LVC; são considerados os principais reservatórios urbanos de *L.*

infantum, impactando tanto humanos quanto cães (DANTAS-TORRES, 2007; GRAMICCIA, 2011; GREENE, 2011).

A prevalência varia geograficamente e está associada a fatores de risco que incluem condições ambientais, práticas de manejo dos cães, e a presença e densidade dos vetores. Áreas endêmicas, como na cidade de Cuiabá, em Mato Grosso, que apresenta altas taxas de prevalência em cães, os fatores de risco estão associados ao tipo de ambiente, se rural ou urbano, presença de atividades agrícolas e os hábitos dos animais (ALMEIDA et al., 2012).

Embora a PCR não seja tradicionalmente reconhecida como um método diagnóstico padrão de excelência, ela tem se estabelecido cada vez mais como uma referência essencial para identificar a *Leishmania* sp. e outros patógenos, graças à sua notável sensibilidade e especificidade. Essa técnica viabiliza a identificação do DNA do parasito em diversos tipos de amostra, incluindo sangue, tecidos, medula óssea, linfonodos, e amostras cutâneas ou de outros tecidos. Dentro desse contexto, a qPCR se sobressai por sua capacidade de detectar DNA parasitário até mesmo em situações de cargas parasitárias muito baixas. Assim, a qPCR emerge como uma ferramenta diagnóstica extremamente eficaz para a Leishmaniose Visceral Canina, ampliando a capacidade dos métodos tradicionais de detecção do parasita (MIRÓ et al., 2017).

Diversos estudos já demonstraram uma relação significativa entre a prevalência da infecção canina e os casos humanos de LV. Devido a sua importância na epidemiologia da doença, investigar a prevalência da infecção canina na região além de buscar maneiras de facilitar o diagnóstico da doença têm importante papel no controle e prevenção da doença. Com isso, o presente estudo objetivou estimar a prevalência de cães positivos para LVC ao longo de 2 anos por meio de qPCR no município de Cuiabá, Mato Grosso. No presente estudo foi possível avaliar e comparar os métodos TaqMan qPCR e SYBR qPCR na detecção de infecção por *L. infantum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo analisou amostras de sangue canino submetidas para diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. por clínicas e hospitais veterinários da cidade de Cuiabá, MT. O período de estudo abrangeu 21 meses, de janeiro de 2021

a setembro de 2022. As amostras de sangue foram submetidas à extração genômica a partir do Kit Magmax Core (Applied Biosystems) conforme seu manual de instrução e os materiais extraídos foram quantificados e qualificados por espectrofotometria com aparelho NanoDrop Lite (ThermoFisher). O diagnóstico da leishmaniose canina foi realizado por meio da amplificação e detecção do cinetoplasto de *Leishmania* spp. (utilizando protocolo de FRANCINO *et al.* (2006). Amostras positivas foram testadas para a amplificação do gene da proteína cathepsina seguindo o protocolo de Silva *et al.* (2019). Estas amostras foram submetidas a reações de *Sybr* qPCR e *endPoint* PCR. Amostras com disparidade de resultados foram processadas posteriormente para a amplificação do gene ITS2 com intuito de sequenciar fragmentos de 370 a 450 pares de bases para fins de identificação. Os primers utilizados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados no experimento.

Primers	Sequência	Referência
LEISH - 1	AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG	Francino <i>et al.</i> , 2006
LEISH - 2	ACCCCAGTTTCCCGCC	
CatLeish F	GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAAG	Silva <i>et al.</i> , 2019
CatLeish R	CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC	
LGITSF2	GCATGCCATATTCTCAGTGTC	Almeida <i>et al.</i> , 2011
LGITSR2	GGCCAACGCGAAGTTGAATTC	

Fonte: Autores.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, Califórnia) e visualizados em um sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hércules, Califórnia), usando o software ImageLab™. Os amplicons de tamanho esperado foram purificados usando o Kit de Purificação de Banda de DNA e Gel de PCR Illustra GFX (GE Healthcare, Chicago, Illinois) e preparados para sequenciação com kit BigDye™ (Applied Biosystems, Foster, Califórnia). Foi utilizado um Analisador Genico ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystems, Foster, California) para procedimentos de sequenciamento com os mesmos iniciadores utilizados para ensaios de PCR. As sequências obtidas foram então submetidas a uma análise da Ferramenta de Busca

de Alinhamento Local Básica (BLAST) (Altschul et al., 1990) para determinar as identidades mais próximas com organismos congêneres disponíveis no GenBank.

A incidência da infecção por *Leishmania infantum* foi estimada conforme Le Rutte et al. (2021). E a análise foi realizada com auxílio dos softwares Excell e EpiInfo 7.0 para Windows.

3 RESULTADOS

Foram avaliadas 896 amostras de sangue encaminhadas para diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. num período de 21 meses, na cidade de Cuiabá, MT. O número de amostras testadas por mês variou de 14 a 75, com média de 42 amostras por mês.

Os resultados obtidos por meios da reação de *Taqman* qPCR estão demonstrados na Tabela 1.

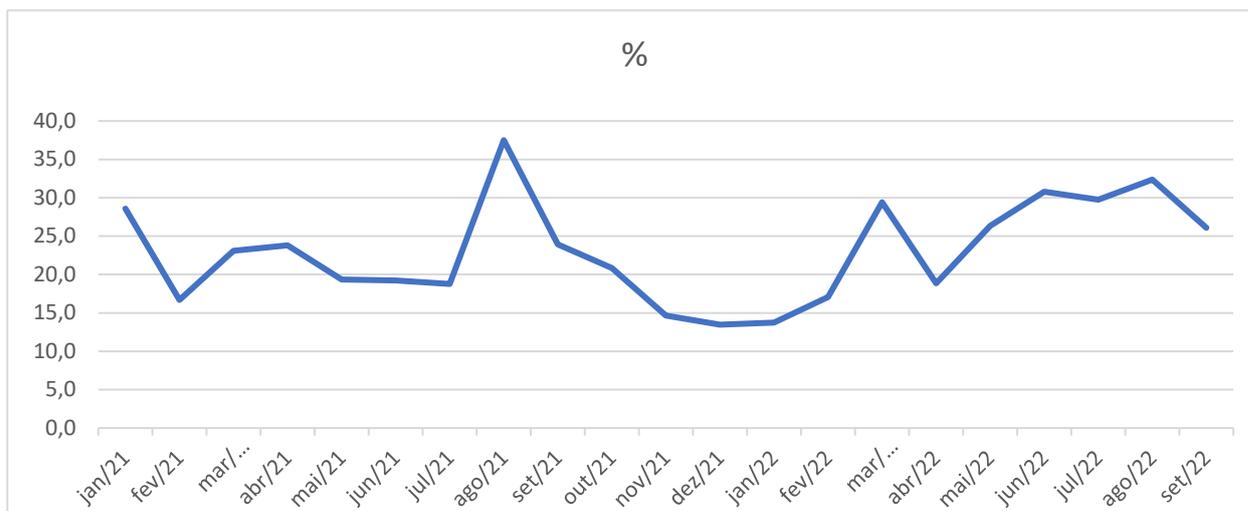
Tabela 1. Frequência de animais positivos para *L. infantum* em Cuiabá, Mato Grosso, no período de jan. 2021 a set. 2022.

	Nº	%
Positivos	210	23,44
Negativos	686	76,56
TOTAL	896	100

Fonte: Autores.

Foram detectados 210 (23,44%) amostras positivas pela reação *Taqman* qPCR (Tabela 1). A incidência de cães detectados com DNA de *Leishmania* sp., por essa técnica variou de 13,5% a 32,4% (Gráfico 1). A taxa de incidência da leishmaniose entre 2021 e 2022 foi de 0,23 casos por mês. A densidade de incidência foi ajustada para 234 casos a cada 1.000 cães por mês.

Gráfico 1. Incidência de animais positivos para *Leishmanis* spp., por Taqman qPCR, em Cuiabá, Mato Grosso, no período de janeiro de 2021 a setembro de 2022.



Fonte: Autores.

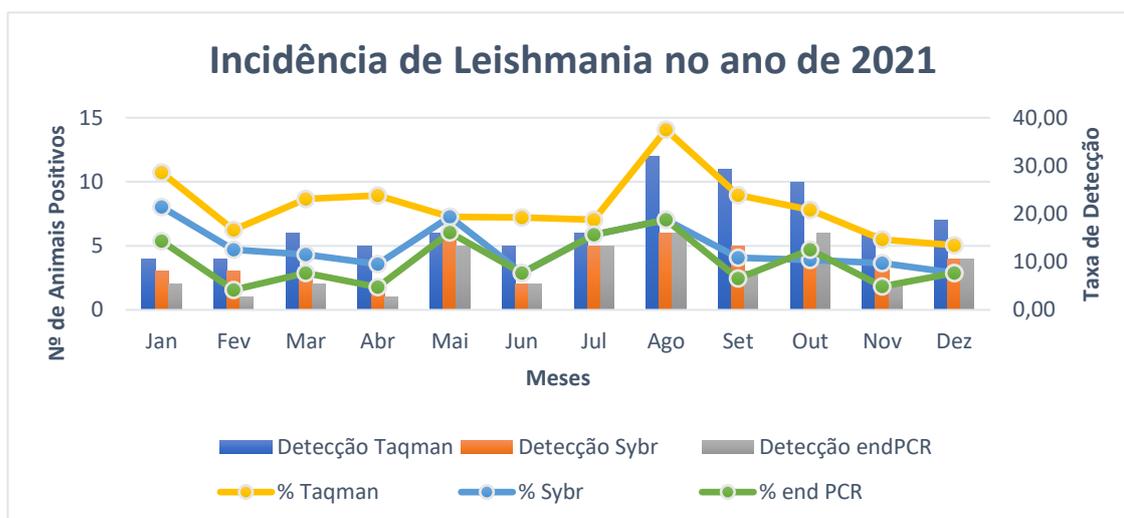
Das amostras positivas pela qPCR *Taqman*, 134 foram confirmadas pela reação de qPCR utilizando como alvo o gene da catepsina de *L. infantum*. E quando este protocolo foi avaliado em reação *endpoint*PCR foram observadas 114 amostras positivas, apresentando bandas de 223 pares de bases (Tabela 2).

Tabela 2. Número de animais detectados positivos para *L. infantum* conforme as diferentes técnicas.

	<i>Taqman</i>	<i>Syber</i>	<i>Endpoint</i>PCR
Animais positivos	210	134	114
Animais Negativos	686	76	96
TOTAL	896	210	210

Fonte: Autores.

Com intuito de observar o comportamento da amplificação do gene da catepsina nos cães *Taqman* positivos, a incidência da infecção por *L. infantum* está apresentada no Gráfico 2.

Gráfico 2. Incidência e Taxa de Detecção de *L. infantum*, no ano de 2021.

Fonte: Autores

A amplificação do gene ITS2 de sete cães resultou em sequências de 385 nucleotídeos. Todas as sequências foram idênticas entre si e com 100% de similaridade com diferentes isolados de *L. infantum* no GenBank. A sequência consensual das sete amostras foi depositada no GenBank sob o número de acesso PP740848.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho estimou a incidência de *L. infantum* em cães suspeitos de infecção submetidos ao diagnóstico molecular. Não foi objetivo neste estudo de estimar a prevalência da infecção na população canina de Cuiabá, uma vez que o cálculo de amostragem não abrangeu a totalidade de cães da cidade, tampouco adotou modelo de amostragem sistemática. O banco de amostras foi construído por conveniência, mas reflete a situação do que ocorreu na cidade durante 21 meses consecutivos.

A frequência de cães positivos para *Leishmania* spp. foi calculada em 23,4%. Valores de frequência de infecção por *Leishmania* em cães no Brasil são mais comumente estimados por resultados sorológicos (BRASIL et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019; MENEGATTI et al., 2020; NAKKOUND et al., 2021; ZUQUE et al., 2022). Por

isso, dados oriundos de inquéritos moleculares são mais escassos, embora venha crescendo nos últimos anos e se tornando mais comum. Conseqüentemente muitos resultados ainda são discordantes, pois não há um método ainda padronizado para todos os laboratórios utilizarem. Por exemplo, resultados de inquérito molecular de leishmania demonstraram valores de 59,2% em cães de Marabá, PA (Campolongo et al., 2022), 84,7% em Campo Grande, MS (Silveira et al., 2018) e 30% em Itaúna, MG (Lopes et al., 2020). Inclusive deve ser considerado que os diferentes estudos também utilizaram amostras de diferentes métodos amostrais, o que torna esta comparação ainda mais desafiante. O presente estudo utilizou amostras de cães com sintomas (suspeitos) provenientes de Clínicas e Hospitais Veterinários na área de Cuiabá, características estas que pode ter aumentado as chances de obter resultado positivo. Estudos anteriores demonstraram uma taxa de prevalência variável no de LVC na cidade de Cuiabá. Pesquisas anteriores em Cuiabá envolvendo 430 cães testados aleatoriamente por imunofluorescência identificaram uma soroprevalência de 22,1% (ALMEIDA et al., 2012), número que embora se assemelhe aos do presente estudo foram estimados com base em exames sorológicos.

Além desses, amostras de cães de comunidades ribeirinhas de Várzea Grande, Santo Antônio do Leverger e Cuiabá, diagnosticadas via PCR, mostraram uma prevalência média de 9,7%, com Cuiabá registrando 0% (SOUSA et al., 2019).

Essas variações nas taxas de incidência podem ser atribuídas às diferenças nos ecossistemas estudados e nos métodos de diagnóstico, sendo a qPCR notadamente mais sensível que métodos sorológicos e PCR convencional. Além disso, estudos como os de Fujimori et al. (2016) e Sousa et al. (2019) indicaram que cães infectados e sintomáticos são mais facilmente diagnosticáveis, semelhante às amostras examinadas neste estudo.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma preocupação significativa em Cuiabá e outras partes do Brasil, especialmente devido às condições ambientais favoráveis para o vetor da doença, o mosquito palha, e a alta presença de cães infectados que facilitam a continuação do ciclo de transmissão.

A taxa de incidência apresentou elevado valor, e deve ser considerado que representa as amostras recebidas em laboratório de análise molecular durante 18 meses. A densidade da incidência considerando a população de 1.000 cães foi estimada em 234 casos, valor muito superior ao relatado em outras literaturas

(AZEVEDO et al., 2008, BORGES et al., 2014; CAMPOS et al., 2017; LE-RUTE et al., 2021). Como ressaltado anteriormente, este valor não deve ser considerado para a população canina da região, pois consideramos que são amostras oriundas de cães suspeitos, e por isso a chance de resultado positivo é maior.

As amostras positivas na qPCR *Taqman* foram testadas por PCR para amplificar fragmento específico do gene da catepsina de *Leishmania infantum*. A reação foi padronizada em formato de *endpoint*PCR (Silva et al., 2019), porém neste estudo optamos por aplicar também o método de qPCR utilizando o corante intercalador de DNA *Sybr*[®] *Green*. Segundo Silva et al. (2019), o fragmento amplificado é específico para *L. infantum*, e dessa forma com a confirmação dos positivos, pode-se inferir que as reações positivas na qPCR *taqman* seria associado a esta espécie. No entanto, das 210 positivas, apenas 134 e 114 confirmaram na qPCR *Sybr Green* e *endpoint*PCR.

Diante deste resultado, 10 amostras foram escolhidas para amplificação do gene ITS23 de leishmania, a fim de determinar a espécie envolvida na detecção. Das 10, sete amostras apresentaram resultado satisfatório e foram sequenciadas. O resultado desta análise demonstrou que as amostras discrepantes entre os diferentes métodos, se tratava de *L. infantum* (Genbank PP740848).

O presente estudo não objetivou comparar os métodos de qPCR, *Taqman*, *Sybr Green* e *endpoint*PCR, mas sim, utilizá-los para confirmar a espécie de leishmania envolvida na infecção dos casos. No entanto, perante os resultados observados na Tabela 2, observou-se que a reação *Sybr Green* confirmou 63,8% dos positivos no *Taqman*, sugerindo menor sensibilidade. A primeira hipótese é de que as amostras não confirmadas seriam associadas a outra espécie que não *L. infantum*, pois o protocolo *Taqman* utilizado neste estudo (Francino et al., 2006) detecta outras espécies de leishmania. Esta hipótese foi descartada com o sequenciamento de *L. infantum* em 7 amostras. A segunda hipótese estaria relacionada a menor sensibilidade do qPCR *Sybr Green* comparado ao *Taqman*.

Tanto o *TaqMan* quanto o *Sybr Green* são químicos usados na qPCR, cada um com vantagens e desvantagens. A *TaqMan* utiliza sondas fluorogênicas específicas para o gene alvo, enquanto o *SYBR Green*, um corante que se liga ao DNA de cadeia dupla, é geralmente menos específico, pois pode se ligar a qualquer DNA de cadeia dupla, incluindo produtos de PCR não-específicos (REZAEI-RAD et al., 2014). O

SYBR Green é frequentemente escolhido por ser mais econômico, já que não requer a síntese de sondas específicas (PEREIRA et al., 2014).

A eficácia da TaqMan foi confirmada em outros estudos para o diagnóstico de *Leishmania* spp. (FILGUEIRA et al., 2020) e de outros agentes (REZAEE-RAD et al., 2014), embora Silva et al. (2013) tenham encontrado resultados praticamente idênticos ao comparar as duas técnicas, incluindo na quantificação de carga parasitária. Em contraste, alguns estudos, como o de Gomes et al. (2017), indicaram uma maior sensibilidade do SYBR Green em comparação ao TaqMan.

Deve-se ressaltar que Francino et al. (2006) durante a padronização do método, calculou a sensibilidade analítica da reação por meio de curva comparativa de Ct. Por outro lado, não há dados publicados sobre o limiar de detecção da amplificação do gene da catepsina pelo método Sybr Green. Por isso devemos evitar tal comparação, tornando este um fator limitante do presente estudo.

Contudo, a literatura sugere que ambos os métodos de qPCR são confiáveis para detectar a infecção por *Leishmania* sp. (PERIS et al., 2021), e a escolha do método deve considerar as vantagens e desvantagens de cada um, bem como as condições específicas do estudo.

5 CONCLUSÃO

A Leishmaniose Visceral é uma zoonose de importância na saúde pública e veterinária, afetando não só a população canina, mas também humanos. Por Cuiabá ser considerada uma região endêmica para doença, buscar formas de diagnóstico rápidos e confiáveis para a LVC é de extrema importância para o controle e prevenção da doença em cães e em humanos.

As estratégias de diagnóstico e monitoramento, incluindo o uso de qPCR Taqman e SYBR demonstram a contínua evolução da tecnologia, a fim de oferecer métodos mais eficazes e precisos na detecção e quantificação do patógeno. Apesar de no presente estudo a qPCR Taqman ter se mostrado mais eficaz e uma taxa de detecção maior, os dois métodos tem suas vantagens e limitações e a escolha depende nas necessidades específicas de cada estudo ou programa de vigilância.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.B.P.F.; Sousa, V.R.F.; CRUZ, F.A.C.S.; DAHROUG, M.A.A.; FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n.4, p.359-365, 2012.
- ALMEIDA, M.E.; STEURER, F.J.; KORU, O.; HERWALDT, B.L.; PIENIAZEK, N.J.; DA SILVA, A.J. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 3143–3149, 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment Search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
- AZEVEDO, M.Á.A.; DIAS, A.K.K.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.3, p.123-127, 2008.
- BORGES, L.F.N.M.; LOPES, E.G.P.; A.C.P.; SILVA, M.X.; HADDAD, J.P.A.; SILVA, J.A.; NICOLINO, R.R.; SOARES, D.F.M. Prevalência e distribuição espacial de Leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n.2, p.352-357, 2014.
- BRASIL, A.W.L.; MACHADO, D.M.R.; SILVA, M.A.R.X.; BARROSA, N.C.; SILVA, R.B.S.; MELO, M.A.; LANGONI, H.; SANTOS, C.S.A.B.; AZEVEDO, S.S. Prevalência e fatores de risco associados às infecções por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em cães atendidos em clínicas veterinárias de João Pessoa, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, n.5, p.2293-2299, 2018.
- CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, v.71, p.86-92, 2007.
- CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G.; CUNHA, L.; MAGALHÃES, L.; MORAES, J.; RAMALHO, D.; LIMA, S.; PACHECO, J.A.; LIPSCOMB, M.; RIBEIRO DE JESUS, A.; PACHECO DE ALMEIDA, R. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v.12, n.1, p.67-73, 2017.
- CAMPOLONGO, C.; SILVA, R.E.D.; AZEVEDO, R.C.F.E.; PESENATO, I.P.; CARIOCA, A.C.F.; ALVES, B.F.; CASTELLI, G.S.N.; ONOFRIO, V.V.; MARCILI, A. Prevalence of *Leishmania infantum* in Dogs from Deforested Areas of the Amazon Biome. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v.22, n.2, p.108-113, 2022.
- 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.

FERREIRA, E.C.; DE MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.F. Leishmanioses do novo mundo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.9-27, 2012.

FILGUEIRA, C.P.B.; MOREIRA, O.C.; CANTANHÊDE, L.M.; FARIAS, H.M.T.; PORROZZI, R.; BRITTO, C.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E. Comparasion and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1-18, 2020.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay of diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

FUJIMORE, M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; DIAS, A.F.L.R.; RODRIGUES, J.Y.; NAKASATO, L.; MADEIRA, M.F.; SOUZA, V.R.F. Prevalence and Associated Factors of Canine Visceral Leishmaniasis in a Endemic Area od Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 4, p.1-4, 2016.

GOMES, C.M.; CESETTI, M.V.; PAULA, N.A.; VERNAL, S.; GUOTA, G.; SAMPAIO, R.N.R.; ROSELINO, A.M. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR using Biopsy ans Swab Samples to Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in a Area Where *Leishmania (viannia) braziliensis* is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.55, n.2, p.526-534, 2017.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1169-1180, 2005.

LAPPIN, M. R. Leishmaniose. In: NELSON, R. W., COUTO, C.G.; **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4a ed.St. Louis: Elsevier; 2010. p.1364-5.

LE RUTTE, E.A.; WILT, L.S.; BULSTRA, C.A.; NIEBOER, D.; KONTOROUPI, P.; VLAS, S.J.; RICHARDUS, J.H. Incidence and geographical distribution of canine leishmaniosis in 2016-2017 in Spain and France. **Veterinary Parasitology: Regional and Studies Reports**, v.25, p.1-5, 2021.

LOPES, J.V.; MICHALSKY, É.M.; PEREIRA, N.C.L.; PAULA, A.J.V.; SOUZA, A.G.M.; PINHEIRO, L.C.; LIMA, A.C.V.M.D.R.; AVELAR, D.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; LANZETTA, V.A.S.; MELO, J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.53, p.1-19, 2020.

MENEGATTI, J.A.; OLIVEIRA-JR, G.J, Silva, L.C.F.; OLIVEIRA, A.; BICA, D.L.C.; SANTOS, P.V.B.A. CUNHA-FIHO, L.F.C.; LUNARDI, M. Fauna flebotomínica e soroprevalência para leishmaniose visceral canina em áreas urbana na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n.4, p.1197-1205, 2020.

PERIS, M.P.; ESTEBAN-GIL, A.; ORTEGA-HERNANDEZ, P.; MORAIS, M.; HALAIHEL, N.; CASTILLO, J.A. Comparative Study of Real-Time PCR (TaqMan Probe and Sybr Green), Serological Techniques (ELISA, IFA and DAT) and Clinical Signs Evaluation, for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Microorganisms**, v. 9, p.1-10, 2021.

PEREIRA, M.R.; ROCHA-SILVA, F.; GRACIELE-MELO, S.; LAFUENTE, C.R.; MAGALHÃES, T.; CALIGIORNE, R.B. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-4, 2014.

REZAEI-ZAD, M.S.; SEPEHRIZADEH, Z.; MOTTAGHI-DASTJERDI, N.; YAZDI, M.T.; SEYATESH, N. Comparison of SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods for quantitative detection of residual CHO host-cell DNA in biopharmaceuticals. **Biologicals**, v. 43, n.2, p. 130-135, 2014.

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.

SILVA, R.E.; SAMPAIO, B.M.; TONHOSOLO, R.; COSTA, A.P.; COSTA, L.E.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; SPERANÇA, M.A.; MARCILI, A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v.19, n.1, p.1-9, 2019.

SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.S.S.; Andrade, S.M.; YOKOO, M.; RIBEIRO, M.L.; BARTCHEWSKY, W.; SOCORRO-SILVA, A.; CASTRO, J.A.F.; MONTE, S.J.H. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, n. 2, p.137-143, 2013.

SILVEIRA, A.P.S.D.; VIEIRA, V.B.D.; BATALINI, L.S.; CARMO, S.B.D.; FRIOZI, E.; ARRUDA, E.J.; LIMA JUNIOR, M.S.D.C.; NEITZKE-ABREU, H.C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.51, n.6, p.843-847, 2018.

SOUZA, C.B.P.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of Canine control on the epidemiology of canine and human Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.5, p.510-517, 2001.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p.190-192, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 13 de set. de 2022.

ZUQUE, M.A.S.; MANZINI, S.; BERTOZZO, T.V.; MARTIN, M.F.A.; PAIXÃO, M.S.; SANTOS, W.J. Ocorrência de *Leishmania* spp. em população canina domiciliada e humana de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul e análise espacial. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p.1-18, 2022.

Apêndice B – Artigo Aceito para publicação.

Artigo Secundário: Relato de Caso Meningite por *Salmonella* sp.

Artigo submetido e aceito para publicação na Revista Observatório de la Economía Latinoamericana, classificada como A4 Qualis Capes, quadriênio 2017-2020.

Meningite por *Salmonella* sp. em cavalo adulto, raça Quarto de Milha, em Cuiabá, Mato Grosso: Relato de Caso

Meningitis caused by *Salmonella* sp. in an adult horse, Quarter Horse breed, in Cuiabá, Mato Grosso: Case Report

Sayanne Luns Hatum de Almeida¹; Lucas Avelino¹; Leonardo de Bruym Denadai²; Maria Júlia de Oliveira Rosa Fonseca¹; Nathalia de Assis Pereira¹; Marcos de Almeida Souza¹; Valéria Dutra¹; Daniel Moura de Aguiar.

RESUMO

Salmonelose destaca-se por ser uma doença que além de atingir animais é considerado um dos mais importantes patógenos de origem alimentar e terceira maior causa de mortes diarreicas em humanos ao redor do mundo. O presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de um cavalo de 4 anos, da raça Quarto de Milha atendido na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, com sintomas neurológicos como nistagma, dismetria, decúbito lateral, ataxia e quadros de convulsão. Em vista do prognóstico desfavorável o animal foi submetido a eutanásia *in extremis* e posteriormente à necropsia, onde foi observado deposição de material amarelado a esverdeado na superfície capsular do baço e pequena deposição de material amarelado e esverdeado nas meninges. A avaliação histopatológica constatou quadro de meningoencefalomielite supurativa moderada a acentuada, multifocal e subaguda, e quadro de edema pulmonar. Os achados histopatológicos juntamente com os resultados da análise do liquor, sugeriam que o quadro foi causado por infecção bacteriana, suspeitando-se de *Salmonella* sp., que posteriormente foi confirmada por meio de Reação em Cadeia Polimerase em tempo real (qPCR). Conclui-se que apesar de ser uma doença normalmente branda e que acomete principalmente animais jovens, os cuidados e as medidas preventivas devem ser tomadas a fim de evitar surtos e óbitos, de animais jovens e adultos, além de evitar também, a transmissão para seres humanos.

Palavras-chave: Cavalo, Meningoencefalomielite, Salmonelose.

ABSTRACT

Salmonellosis stands out for being a disease that, in addition to affecting animals, is considered one of the most important foodborne pathogens and the third leading cause of diarrheal deaths in humans around the world. The present work aims to report a case of a 4-year-old Quarter Horse treated in the city of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, with neurological symptoms such as nystagmus, dysmetria, lateral decubitus, ataxia and seizures. In view of the unfavorable prognosis, the animal was submitted to euthanasia in extremis and later to necropsy, where a deposition of yellowish to greenish material was observed on the capsular surface of the spleen and a small deposition of yellowish and greenish material in the meninges. The histopathological evaluation revealed a picture of moderate to severe suppurative meningoencephalomyelitis, multifocal and subacute, and a picture of pulmonary edema. The histopathological findings, together with the results of the analysis of the cerebrospinal fluid, suggested that the condition was caused by bacterial infection, with suspicion of *Salmonella* sp., which was later confirmed by means of real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). It is concluded that despite being a normally mild disease that mainly affects young animals, care and preventive measures must be taken in order to avoid outbreaks and deaths, in young and adult animals, in addition to preventing transmission to animals. humans.

Keywords: Horse, Meningoencephalomyelitis, Salmonellosis

RESUMEN

La salmonelosis se destaca por ser una enfermedad que, además de afectar a los animales, es considerada uno de los patógenos alimentarios más importantes y la tercera causa de muerte por diarrea en humanos en todo el mundo. El presente trabajo tiene como objetivo reportar un caso de un Quarter Horse de 4 años tratado en la ciudad de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, con síntomas neurológicos como nistagma, dismetría, decúbito lateral, ataxia y convulsiones. Ante el pronóstico desfavorable, el animal fue sometido a eutanasia in extremis y posteriormente a necropsia, donde se observó un depósito de material amarillento a verdoso en la superficie capsular del bazo y un pequeño depósito de material amarillento y verdoso en las meninges. La evaluación histopatológica reveló un cuadro de meningoencefalomielitis supurativa moderada a grave, multifocal y subaguda, y un cuadro de edema pulmonar. Los hallazgos histopatológicos, junto con los resultados del análisis del líquido cefalorraquídeo, sugirieron que la afección fue causada por infección bacteriana, con sospecha de *Salmonella* sp., Que luego fue confirmada mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). Se concluye que a pesar de ser una enfermedad normalmente leve que afecta principalmente a animales jóvenes, se deben tomar medidas de cuidado y prevención para evitar brotes y muertes, en animales jóvenes y adultos, además de prevenir la transmisión a los animales humanos.

Palabras clave: Caballo, meningoencefalomielitis, salmonelosis

3. INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas oficiais publicadas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2010, a população de equinos ao redor do mundo era de aproximadamente 60 milhões de cabeças e cerca de 54% desse rebanho encontra-se distribuído nos Estados Unidos, China, México, Brasil e Argentina. Com cerca de 5,5 milhões de animais, o Brasil possui o quarto maior rebanho de equinos do mundo e a atividade voltada a esse meio, movimenta no país, cerca de 16,5 bilhões de reais, anualmente e gera aproximadamente 3 milhões de postos de trabalho (Lima & Cintra, 2010).

É no Sudeste do país, onde encontra-se maior parte de sua população, seguido do Nordeste, Centro Oeste, Sul e Norte (IBGE, 2017). Segundo dados divulgados pelo IBGE, em 2017, Mato Grosso ocupa a quinta posição em quantidade de animais, com cerca de 283.480 animais, que além de serem utilizados no esporte, são de suma importância para a agropecuária local, principalmente na cadeia produtiva bovina.

Doenças contagiosas em animais e pessoas têm desempenhado um importante papel da civilização (SMITH, 2004), e no ponto de vista animal ainda são um dos principais desafios para veterinários, proprietários e que causam diversos prejuízos econômicos ao setor agropecuário. Dentre essas doenças, a Salmonelose destaca-se por ser uma doença que além de atingir animais é considerado um dos mais importantes patógenos de origem alimentar e terceira maior causa de mortes diarreicas em humanos ao redor do mundo (FERRARI et al., 2019).

A *Salmonella* sp., é um bastonete gram negativo, anaeróbio facultativo pertence à família Enterobacteriaceae (MARTELLI et al., 2018). Em equinos está associada a surtos em eventos equestres, centros de treinamento e mais frequentemente em hospitais veterinários. Nesses animais a transmissão se dá por via fecal oral, ou por ingestão de alimentos ou água contaminados. Potros e animais mais jovens são mais propensos a infecção, e como fatores de risco podem ser citados estresse, transporte, hospitalizações, mudanças na alimentação e superlotação (BURGESS & MORLEY, 2014; MARTELLI et al., 2018).

Em alguns cavalos a infecção pode permanecer subclínica ou causar uma doença leve, no entanto casos mais graves também são observados, e podem acarretar óbito. A doença cursa frequentemente com um quadro gastrointestinal, onde a replicação da bactéria no cólon, causa danos significativos à mucosa do intestino, e como consequência há grande e rápida perda de fluido, resultando em compactação em cólon, distensão de intestino e refluxo gástrico, entre outros sinais de cólica. O quadro geralmente evolui para diarreia, hipertermia, inapetência e depressão. A mucosa lesionada, permite a passagem da *Salmonella* sp. para a corrente sanguínea, que pode acarretar septicemia e por consequência em alguns casos, meningites.

O presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de meningoencefalite causado por *Samonella* sp. em um cavalo adulto, da raça Quarto de Milha, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

4. RELATO DE CASO

No dia 03 de março de 2021, às 13 horas, foi solicitado atendimento médico veterinário em uma propriedade localizada na Comunidade Rio dos Peixes, interior da cidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, para atender o caso de um cavalo da raça Quarto de Milha, com aproximadamente 4 anos de idade, de pelagem Tordilha pesando cerca de 480 kg. Na anamnese, tratador relatou que ouviu barulhos como se o animal estivesse se debatendo no chão, e ao chegar na baia em que ele se encontrava, o animal se assustou e acabou por colidir com a cabeça na parede, e após esse episódio passou a apresentar ataxia.

Na avaliação clínica, foi constatado que o animal apresentava sinais neurológicos, como nistagma, demonstrado na Figura 1, dismetria, decúbito lateral, ataxia e quadros convulsivos. Ao exame físico verificou-se uma frequência cardíaca (FC) de 60 batimentos por minuto (bpm), frequência respiratória (FR) de 36 movimentos por minuto (mpm), tempo de enchimento capilar (TPC) de 3 segundos, temperatura retal de 38,7°C e motilidade intestinal diminuída em todos os quadrantes.



Figura 1. Cavalo com sinais clínicos neurológicos atendido em propriedade localizada no interior de Cuiabá – Mato Grosso. Animal em decúbito lateral com lacerações (A) com nistagma e lacerações também na cabeça (B), causados pelos ataques convulsivos.

Fonte: Autores (2021).

Com base no quadro em que se encontrava e ao histórico de um possível trauma, optou-se por iniciar o tratamento sintomático. Foi realizada a venopunção da jugular direita com cateter nº14 e iniciada fluidoterapia com Ringer Lactato (RL), sendo utilizados no total cerca de 20 litros de RL. Foram administrados, ainda, Flunexim Meglumine, na dose de 1,1mg/Kg e 200mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) por via endovenosa. A antibioticoterapia foi realizada usando Sulfa Trimetopim, na dose equivalente a 12,0 mg de sulfadoxina/kg e 2,4 mg de trimetoprima/kg. A princípio o animal apresentou uma nistagma, conseguiu sair do decúbito e se levantar. Os quadros convulsivos diminuíram, e o animal voltou a se alimentar e ingerir água.

Porém no dia 04 de março de 2021, o animal voltou a apresentar quadros convulsivos e a ficar em decúbito. Para controlar as convulsões iniciou-se o uso de Diazepan na dose de 0,5mg/Kg associado a Detomidina e Butorfanol na dose de 0,02mg/Kg e 0,01mg/Kg, respectivamente, porém sem muita melhora no quadro. Em vista do prognóstico desfavorável o animal foi submetido a eutanásia *in extremis* e posteriormente à necropsia. No exame externo do animal, foram observados apenas lacerações de pele pelo corpo devido as quedas que sofreu, pela descoordenação em que estava, sem mais alterações macroscópicas dignas de nota. Ao exame interno da cavidade torácica foi observado que pulmão se encontrava aumentado de tamanho, com grande quantidade de espuma na luz de traqueia e brônquios, enquanto na cavidade abdominal, o baço apresentava deposição de material amarelado a esverdeado em sua superfície capsular. E a avaliação macroscópica de encéfalo demonstrou pequena deposição de material amarelado e esverdeado nas meninges.

Figura 2. Foto da abertura da cavidade abdominal, onde é possível observar a deposição de conteúdo amarelado a esverdeado na superfície capsular do baço.



Fonte: Autores (2021).

Amostras de todos os órgãos foram coletados em formol a 10% para avaliação histopatológica e amostra do encéfalo foi coletado em saco estéril e refrigerado em isopor com gelo para cultura. Além disso, a punção de medula foi realizada para coleta de líquido que foi encaminhado para a realização de citologia.

A amostra de encéfalo enviada para cultura, foi semeada aerobicamente em ágar sangue e ágar McConkey e incubada a 37° C, por um período de até 72h, onde não

foi constatado crescimento bacteriano. Os resultados da avaliação do líquido se encontram na Tabela 1. A avaliação microscópica do líquido revelou presença de 86% de neutrófilos (destes, cerca de 30% encontravam-se degenerados e realizando fagocitose de bactérias) e 14% de macrófagos (em um total de 2300 células).

Na Tabela 1, é possível observar os resultados obtidos da análise química e física do líquido coletado.

Tabela 1. Resultados da análise do Líquor.

Análise de Líquor - LCR			Valores de Referência (KANEKO et al.,2008)
Exame Físico	Cor	Amarelo	-
	Aspecto	Turvo	-
	Densidade	1014	-
	Coagulação	Ausente	-
Exame Químico	pH	7	7 - 9
	Glicose	11,3 mg/dL	40 - 80 mg/Dl
	Proteína	189 mg/dL	12 - 40 mg/Dl
	Cloretos	116,2 mg/dL	130 - 240 mg/dL
Exame de Sedimento	Hemácias	298	0/mm ³
	Leucócitos	1800	0 - 8/mm ³
	Bactérias	Presentes - Moderados	Ausentes
	Fungos	Ausentes	Ausentes

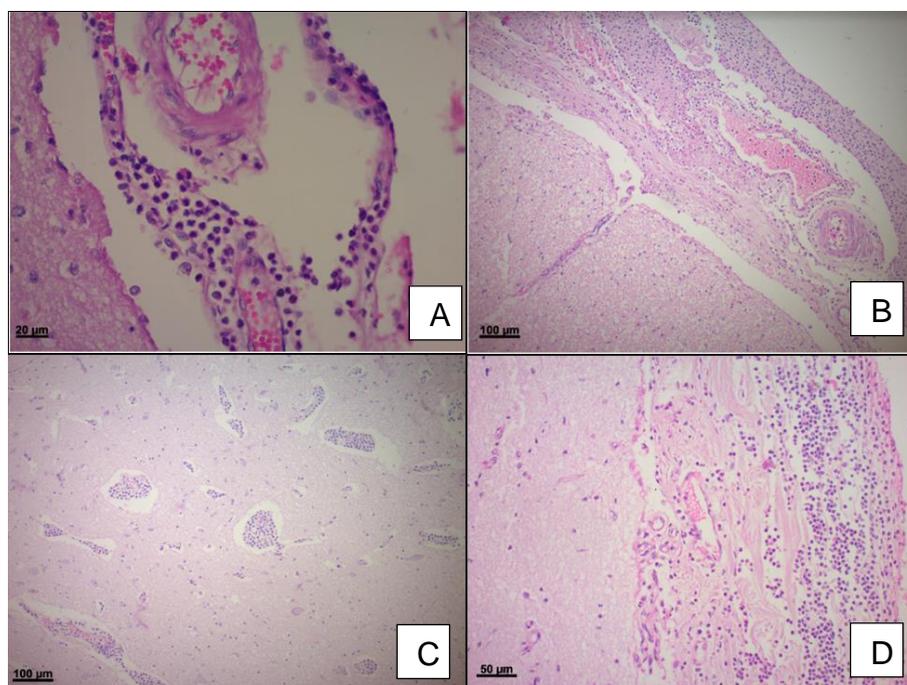
Fonte: Autores (2021).

É possível observar nos resultados da análise do líquido, que o animal apresentava concentração de proteína muito acima dos valores de referência. Essa alteração ocorreu provavelmente devido à resposta a inflamação na região, e geralmente está associada a casos de meningite, abscessos cerebrais, tumores cerebrais, traumas no cérebro, entre outras doenças neurológicas degenerativas (SANTOS et al., 2012). Além disso, foi constatado aumento no número de hemácias, que indica presença de hemorragia, seja por trauma, ou pela coleta. Como o animal apresentou diversos quadros de convulsão e queda, a hemorragia pode estar associada a isso.

O número de leucócitos presentes por mm^3 também foi outro parâmetro que se mostrou aumentado. Essa contagem total de leucócitos está intimamente relacionada a um quadro de processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC) e a identificação do tipo de célula presente é uma ferramenta importante que pode ser utilizada para auxiliar o diagnóstico (Strasinger & Lorenzo, 2008). No caso aqui relatado, esse aumento de leucócitos se deu pelo predomínio de neutrófilos, que é tipicamente observado em quadros de meningite bacteriana (Gnutzmann et al., 2016), que condiz com os outros achados encontrados, que foi a presença de bactérias e de neutrófilos fagocitando bactérias.

Na avaliação histopatológica foi observada presença de infiltrado inflamatório neutrofílico no espaço subaracnóideo e no espaço perivascular no parênquima do SNC com distribuição multifocal e moderada, além de presença também de leve infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, e conteúdo eosinofílico na luz de vasos sanguíneos (trombos) (Figura 3). No pulmão foi constatada deposição de conteúdo eosinofílico amorfo interalveolar moderada e multifocal, congestão moderada e multifocal e presença de infiltrado linfoplasmocitário peribronquial leve e multifocal. Os demais órgãos não apresentaram alterações dignas de nota. Os achados condizem com quadro de meningoencefalomielite supurativa moderada a acentuada, multifocal e subaguda, e quadro de edema pulmonar.

Figura 3. Imagens histopatológicas de Éncefalo e Medula Espinhal. Infiltrado inflamatório neutrofílico entremeando a leptomeninge cerebral. H.E, Obj. 40x. (A); difuso e acentuado espessamento das meninges por infiltrado inflamatório e material fibrilar amorfo e eosinofílico, além de um trombo obliterando parcialmente a luz vascular (asterisco). H.E, Obj. 10x (B); Parênquima cerebral exibindo um infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos no espaço perivascular. H.E, Obj. 10x (C); Infiltrado inflamatório focalmente extenso, composto principalmente por neutrófilos e que se entende das leptomeninges ao córtex cerebral. H.E, Obj. 20x (D).



Fonte: Autores.

As alterações observadas, assim como resultado obtido da análise do liquor indicavam um quadro associado a infecções de causa bacteriana, e a *Salmonella* sp. é citada na literatura causando lesões semelhantes. A partir desse momento, foi então solicitado um exame de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para esse agente.

A extração se deu a partir de fragmento de encéfalo, utilizando-se o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR. A amplificação por PCR do DNA extraído para detecção de *Salmonella* sp. foi realizada de acordo com publicações

anteriores (SUH, SONG, 2005) utilizando os primers SAF (5'- TTG GTG TTT ATG GGG TCG TT - 3') e SAR (5'- GGG CAT ACC ATC CAG AGA AA - 3') que produzem um amplicon de 298pb. A partir dessa reação a amostra foi confirmada positiva para *Salmonella* sp.

Os sinais clínicos e achados macroscópicos e histopatológicos são consistentes com os descritos em casos de meningoencefalomielite bacteriana equina (STUART et al., 1973; PATTERSONKANE et al., 2001; PELLEGRINI-MASINI & LIVESEY, 2006; TOTH et al., 2012). Esses casos apesar de não ocorrerem com frequência (PATTERSON-KANE et al., 2001; VIU et al., 2012), são descritos na literatura, acometendo comumente neonatos (OLIVEIRA et al., 2019), e geralmente acarretando morte do animal. Já os processos inflamatórios no SNC provocados pela *Salmonella* sp. são extremamente raros nos animais domésticos em geral. Nos equinos, as infecções por *Salmonella* sp. na maioria das vezes permanecem subclínicas ou causam uma doença leve, comumente associados à quadros gastrointestinais (MARTELLI et al., 2018). Os quadros mais graves, que atingem o SNC, geralmente estão associados à septicemia e acometem principalmente neonatos e potros (STUART, et al., 1973; OLIVEIRA et al., 2019), diferentemente do relato aqui descrito, de um animal adulto. Em humanos, é considerada uma doença predominante de crianças, também sendo rara em adultos, e geralmente, quando ocorre, acomete pessoas imunocompetentes (KAUFFMAN, 1979; NADEEN et al., 2019).

A *S. enterica* sorovar Typhimirium é a espécie mais comumente relacionada a casos de meningoencefalite em humanos (ADHIKARY et al., 2013; KEDDY et al., 2015), e também em animais domésticos. Coura et al. (2015) descreveram esse agente causando doença entérica e sistêmica, e por consequência acometendo SNC, em bezerros. Na espécie equina, além de Oliveira et al. (2019), descreveram um caso de meningite em potro causado por *S. enterica* sorovar Typhimirium, Stuart et al. (1973) relataram, quadro semelhante, causado pela espécie *S. agona*. A sorotipagem da *Salmonella* sp. é realizada por meio de caracterização antigênica, da bactéria obtida por meio de isolamento em cultura, de acordo com Grimont e Weill (2007). Como no caso aqui relatado, não foi possível realizar esse isolamento, não conseguimos identificar o sorovar envolvido.

Após a determinação da cauda da meningite, os proprietários foram informados e orientados, visto que a Salmonelose é uma doença zoonótica e a *Salmonella* sp. é

altamente virulenta e patogênica (Martelli et al., 2018), podendo haver risco de outros animais se infectarem e até os humanos que trabalham com os animais. Foi orientado que se fizesse a desinfecção da baia e utensílios utilizados com o animal que veio a óbito e destacou-se a importância das medidas de higiene pessoal dos trabalhadores e proprietários do local.

5. CONCLUSÃO

Apesar de, na maioria dos casos, a Salmonelose se manifestar de maneira subclínica ou doença gastrointestinal branda nos equinos, em alguns casos, o quadro pode ser mais severo e evoluir para morte do animal. Animais adultos também podem ser afetados, embora animais mais jovens sejam os que são comumente atingidos. Por ser uma bactéria altamente virulenta e patogênica, a aplicação de medidas preventivas no plantel é de extrema importância para evitar surtos e perdas, além de evitar transmissão também para humanos, visto que é uma zoonose.

6. REFERÊNCIAS

- Adhikary,R.; Joshi, S.; Ramakrishnan, M. Salmonella typhimurium meningitis in infancy. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v.17, n.6, p.392-393, 2013. DOI: 10.4103/0972-5229.123464
- Burguess, B.A.; Morley, P.S. Managing *Salmonella* in Equine Populations. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.30, n.3, p.623-640, 2014. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.08.005
- Coura, F.M.; Uribe, J.A.Z.; Lasmar, P.V.F.; Carvalho, A.U.; Facury-Filho, E.J.; Silva, M.V.P.; Lage, A.P.; Heinemann, M.B. Systemic and enteric salmonellosis in calves. **Semina. Ciênc. Agrárias**, v.36, n.3, p.2041-2046, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2041
- Ferrari, R.G.; Rosario, D.K.A.; Cunha-Neto, A., Mano, S.B.; Figueiredo, E.E.S.; Conte-Junior, C.A. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. **Appl. Environmental Microbiology**, v.85(14):1-21, 2019. DOI: 10.1128/AEM.00591-19
- Gnutzmann, L.V.; Plewka, J.; Suldofski, M.T.; Felisberto, M.; Nesi, V. Análise dos valores de referência do líquido cefalorraquidiano. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.48, n.3, p.189-197, 2016.

Grimont, P.A.D.; Weill, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris: Institut Pauster. 2007.

IBGE. (2006). Censo agropecuário 2006. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6920#resultado>>. Acesso em: 05 jun 2022.

Kaneko, J.; Harvey.; Bruss, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. [S. I.]: Academic Press, 2008.

Kauffman, C.A.; Hilaire, R.J. Salmonella meningitis. Occurrence in na adult. **Archives of Neurology**, v.36, n.9, p.578-580, 1979. DOI: 10.1001/archneur.1979.00500450072015

Keddy, K.H.; Sooka, A.; Musekiwa, A.; Smith, A.M.; Ismail, H.; Tau, N.P.; Crowther-Gibson, P.; Ângulo, F.J.; Klugman, K.P. Clinical and microbiological features of Salmonella meningitis in a South African population, 2003-2013. **Clinical Infectious Diseases**, v.61, n.4, p.272-282, 2015. DOI: 10.1093/cid/civ685

Lima, R.A.S.; Cintra, A.G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>>. Acesso em: 08 abr 2022.

Martelli, F.; Kidd, S.; Lawes, J. *Salmonella* and Salmonellosis in horses: na overview. **Veterinary Record**, v.182, n.23, p.659-660, 2018. DOI: 10.1136/vr.k2525

Nadeem, R.; Elahi, N.; Elhoufi, A.; Elsousi, A.; Chaudhry, M. Salmonella typhi Meningitis in na Immunocompetent Asian adult. **Cureus**, v.11, n.11, p.1-5, 2019. DOI: 10.7759/cureus.6112

Oliveira, J.G.; Ramos, C.P.; Rocha, I.A.; Marcelino, S.A.C.; Pierezan, F.; Palhares, M.S.; Maranhão, R.P.A.; Silva, R.O.S.; Teixeira, R.B.C. *Salmonella* Typhimurium – associated meningoencephalomyelitis in a foal. **Ciência Rural**, v.49, n.8, p.1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190008>

Patterson-Kane, J.C.; Bain, F.T.; Donahue, J.M.; Harrison, L.R. Meningoencephalomyelitis in a foal due to Salmonella agona infection. **New Zealand Veterinary Journal**, v.49, n.4, p.159-161, 2001. DOI: 10.1080/00480169.2001.36224

Pellegrini-Masini, A.; Livesey, L.C. Meningitis and encephalomyelitis in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.22, n.2, p.553-589, 2006. DOI: 10.1016/j.cveq.2006.03.003

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. Ed. Cold Spring Harbor, 1989.

Santos, J.F.; Moraes, M.F.D.; Maciel, T.A.; Duarte-Neto, P.J.; Mendonça, C.L.; Oliveira, D. Características físico-químicas e citológicas do líquido ovinos sadios da raça Santa Inês. **Ciência Rural**, v.13, n.3, p.382-387, 2012. DOI: 10.5216/cab.v13i3.16386

Smith, B.P. Evolution of equine infection control programs. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.20, n.3, p.521-530, 2004. DOI: 10.1016/j.cveq.2004.07.002

Strasinger, S.K.; Lorenzo, M.S.D. **Urinalysis and body fluids**. 5^a ed. Philadelphia: F. A. Davis Company. 2008

Stuart, B.P.; Martin, B.R.; Williams-Jr, L.P.; Von-Byern, H. Salmonella-induced meningoencephalitis in a foal. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.162, n.3, p.211–213, 1973.

Suh, D.K.; Song, J.C. (2005) Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. In swine specimes by multiplex polymerase chain reaction **Journal of Veterinary Science**, v.6, n.3, p.231-237, 2005.

Toth, B.; Aleman, M.; Nogradi, N.; Madigan, J. E. Meningitis and meningoencephalomyelitis in horses: 28 cases (1985–2010). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.240, n.5, p.580-587, 2012. DOI: 10.2460/javma.240.5.580

Viu, J.; Jose-Cunilleras, E.; Cesarini, C.; Añor, S.; Armengou, L. (2012) Clinical findings in 10 foals with bacterial meningoencephalitis. **Equine Veterinary Journal**, v.41, p.100-104, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00508.x

Anexo A - Classificação dos Periódicos

Observatório de La Economía Latinoamericana

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020 ▾

Área de Avaliação:

MEDICINA VETERINÁRIA ▾ +

ISSN:

Título:

OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA

Classificação:

A4 ▾

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
1696-8352	OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA	MEDICINA VETERINÁRIA	A4	ADMINISTRAÇÃO PÚBLICA E DE EMPRESAS, CIÊNCIAS CONTÁBEIS E TURISMO

Anexo B – Normas para Submissão Artigo

Observatório de La Economía Latinoamericana



Diretrizes para Autores

A Revista **Observatório de la Economía Latinoamericana** aceita apenas artigos originais, não publicados em outros periódicos. Aceitamos artigos apresentados em eventos, desde que essas informações sejam disponibilizadas pelos autores.

Os padrões para formatação e preparação de originais são:

- Máximo 20 páginas;
- Idiomas permitidos: Português, Inglês ou Espanhol;
- Autoria: máximo de 8 autores por artigo;
- Fonte Times New Roman tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- As Figuras e Tabelas devem corresponder ao texto, editável, em fonte 10, tanto no conteúdo quanto no título (que deve vir logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve vir logo abaixo do elemento gráfico).
- Título em português, inglês e espanhol, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo e palavras-chave com espaçamento simples, logo abaixo do título;
- **As referências deverão seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).**
- Para baixar o Template para autores clique [aqui](#)

Taxa de publicação

- Esta revista não cobra taxa de submissão;
- Esta revista cobra a publicação de artigos, no valor de: R\$ 685,00 (brasileiros) por artigo a ser publicado e 180 usd (outras nacionalidades).

Artigos

Política padrão da seção

Faça uma nova submissão na seção [Artigos](#) .

Aviso de direitos autorais

A revista **Observatorio de la Economía Latinoamericana** reserva-se o direito de modificar as alterações normativas, ortográficas e gramaticais originais, a fim de manter o padrão de culto da língua, respeitando o estilo dos autores. Os trabalhos finais não serão enviados aos autores.

Declaração de privacidade

- O conteúdo dos artigos é de exclusiva responsabilidade dos autores.
- É permitida a reprodução total ou parcial do conteúdo dos artigos, desde que citada a fonte.
- Artigos com plágio serão recusados, e o autor do plágio perderá o direito de publicação nesta revista.
- Os nomes e endereços informados nesta revista serão utilizados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação e não são disponibilizados para outros fins ou a terceiros.
- Uma vez submetidos os artigos, os autores cedem os direitos autorais de seus artigos ao OLEL. Caso se arrependa da submissão, o autor tem o direito de solicitar ao OLEL a não publicação do seu artigo. Porém, esta solicitação deverá ocorrer até dois meses antes da divulgação do número em que o artigo será publicado.
- A OLEL utiliza a licença Creative Commons CC BY. Informações sobre esta licença podem ser encontradas em: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/br/>

Anexo D – Comprovante de Submissão do Artigo Objeto da Tese

I. Comprovação de Submissão do artigo “Incidência da Infecção por *Leishmania infantum* em cães atendidos em clínicas e hospitais Veterinários da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 e 2022” na Revista Observatório de Economía Latinoamericana

04/05/2024, 00:19

Gmail - [olatin] Submission Acknowledgement



Sayanne Luns Hatum De Almeida <sayhatum@gmail.com>

[olatin] Submission Acknowledgement

Revista Observatorio Latino Americano <ojs@observatoriolatinoamericano.com>

4 de maio de 2024 às
00:18

Para: Sayanne Luns Hatum de Almeida <sayhatum@gmail.com>

Sayanne Luns Hatum de Almeida:

Thank you for submitting the manuscript, "Incidência da Infecção por *Leishmania infantum* em cães atendidos em clínicas e hospitais Veterinários da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, entre 2021 e 2022." to OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Submission URL: <https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/authorDashboard/submission/4500>
Username: sayhatum

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Equipe Editorial

[OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA](#)

Anexo D – Aceite do Artigo Secundário: Meningite por *Salmonella* sp. em equino.

I. Confirmação do Aceite na Revista Observatório de Economia Latinoamericana



Sayanne Luns Hatum De Almeida <sayhatum@gmail.com>

[olatin] Editor Decision

Revista Observatorio Latino Americano <ojls@observatoriolatinoamericano.com>
Para: Sayanne Luns Hatum de Almeida <sayhatum@gmail.com>

8 de janeiro de 2024 às 10:49

Prezado, bom dia!

Após avaliação editorial, seu artigo teve parecer POSITIVO para publicação.

Segue abaixo instruções para darmos continuidade ao processo de publicação de seu artigo:

- **O artigo deve conter no máximo 20 laudas e 8 autores.** Caso estes limites sejam ultrapassados cobraremos uma taxa extra.
- Idiomas permitidos: Português, Inglês e Espanhol;
- Fonte Arial, tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- As Figuras e Tabelas devem corresponder ao texto, editável, em fonte 10, tanto pelo conteúdo quanto pelo título (que deve aparecer logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve aparecer logo abaixo do elemento gráfico);
- Título em português, inglês ou espanhol, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo acompanhado de palavras-chave, com espaçamento simples, logo abaixo do título;

