



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

HUGO GABRIEL GOMES FREIRE BEZERRA

ANÁLISE DO SORO POR PCR DE CÃES ATENDIDOS NO HUVet-CCA/UFPB
SUSPEITOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

AREIA

2023

HUGO GABRIEL GOMES FREIRE BEZERRA

**ANÁLISE DO SORO POR PCR DE CÃES ATENDIDOS NO HUVet-CCA/UFPB
SUSPEITOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Felipe Nael
Seixas.

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B574a Bezerra, Hugo Gabriel Gomes Freire.

Análise do soro por pcr de cães atendidos no
HUVet-CCA/UFPB suspeitos para leishmaniose visceral /
Hugo Gabriel Gomes Freire Bezerra. - Areia:UFPB/CCA, 2023.
21 f. : il.

Orientação: Felipe Nael Seixas.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Medicina Veterinária. 2. Leishmania. 3. Zoonose.
4. Diagnóstico. 5. Flebotomíneos. I. Seixas, Felipe
Nael. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(02)

HUGO GABRIEL GOMES FREIRE BEZERRA

ANÁLISE DO SORO POR PCR DE CÃES ATENDIDOS NO HUVet-CCA/UFPB
SUSPEITOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado em: 09/11/2023.

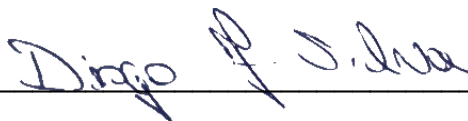
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Nael Seixas (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. (a) Dr. (a) Valeska Shelda Pessoa de Melo
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Me. Dr. Diogo Manoel Farias da Silva
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A minha mãe, que sempre está comigo em meus momentos difíceis e alegrias na vida.

Ao meu falecido companheiro animal, Apolo, que se foi por complicações relacionadas a Leishmaniose, me motivando a trabalhar e aprender mais sobre a afecção.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que guiou o meu caminho e me manteve forte durante minha jornada.

Ao Professor Felipe Nael Seixas, meu Orientador, pela paciência e pela dedicação durante a elaboração do trabalho, e pela contribuição acadêmica na minha formação, sem você isso não seria possível.

À professora Danila Barreiro pelo conhecimento, disponibilidade e pelo auxílio ao longo do projeto, sua excelência como pesquisadora inspira minha alma científica.

À minha mãe Luciene Gomes, por suportar a distância física que o curso promoveu e por não permitir a distância emocional, estando sempre no meu coração.

Aos professores do Curso da UFPB, que ao longo do curso, contribuíram, para formação de um profissional confiante e capacitado.

Aos funcionários da UFPB, em especial à Clara Vasconcelos, que demonstrou confiança e leveza nas longas horas de experimento.

Aos “Moribundos”, Aline Honório e todos os amigos que me acompanharam durante minha jornada, amo muito vocês.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma afecção de alta relevância devido ao seu caráter zoonótico, é conhecida popularmente como calazar. Causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida através de vetores flebotomíneos. No Brasil, a LV é causada de forma endêmica pela espécie *Leishmania infantum*, cujo vetor principal é a *Lutzomyia longipalpis*. O cão nas áreas urbanas é apontado como o principal reservatório doméstico, favorecendo a transmissão ao ser humano. O diagnóstico deve ser baseado nos dados epidemiológicos e sinais clínicos, porém, para diagnóstico confirmatório, devem ser realizados exames laboratoriais, entre eles a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta pesquisa objetivou adequar método PCR para diagnóstico de leishmaniose visceral canina, utilizando 50 amostras residuais de exames hematológicos de cães atendidos no Hospital Universitário Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (HUVet/CCA/UFPB). Nas quais obtivemos resultado positivo em 2% amostras, O resultado demonstra que o PCR consegue detectar DNA da *Leishmania* através de amostras de soro, proveniente da realização de outros exames de rotina e seu resultado positivo é suficiente para diagnóstico confirmatório, podendo ser adotado como exame complementar no HUVet.

Palavras-Chave: leishmania; zoonose; diagnostico; flebotomíneos; protozoário.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a highly relevant condition due to its zoonotic nature, commonly known as kala-azar. It is caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, transmitted through phlebotomine vectors. In Brazil, VL is endemically caused by the species *Leishmania infantum*, with the main vector being *Lutzomyia longipalpis*. Dogs in urban areas are identified as the primary domestic reservoir, facilitating transmission to humans. Diagnosis should be based on epidemiological data and clinical signs; however, confirmatory diagnosis requires laboratory tests, including Polymerase Chain Reaction (PCR). This research aimed to adapt the PCR method for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, using 50 residual samples from hematological tests of dogs treated at the Hospital Universitário Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (HUVet/CCA/UFPB). We obtained a positive result in 2% of the samples. The outcome demonstrates that PCR can detect *Leishmania* DNA in serum samples obtained from routine tests, and its positive result is sufficient for confirmatory diagnosis, making it a valuable complementary test at HUVet.

Keywords: leishmania; zoonosis; diagnosis; phlebotomines; protozoan.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Geral	10
2.2	Específico	10
3	METODOLOGIA	11
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5	CONCLUSÃO.....	15
	REFERENCIAS	17
	APÊNDICE A - CONCENTRAÇÃO EM NG/μL DE DNA DE CADA AMOSTRA UTILIZADA NO ESTUDO	20

CAPITULO I

ARTIGO CIENTIFICO - ANÁLISE DO SORO POR PCR DE CÃES ATENDIDOS NO HUVet-CCA/UFPB SUSPEITOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) sendo uma afecção de alta relevância em termos de repercussão à saúde animal e humana, haja vista seu caráter zoonótico (SOUZA et al., 2013), está presente na maior parte dos continentes - Ásia, África, Europa e Américas. Essa incidência é por vezes, negligenciada, cursando com cerca de 700 mil a 1 milhão de novos casos por ano.

Considera-se três principais formas de apresentação da doença: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea; sendo a forma visceral responsável por infectar todo ano entre 50 a 90 mil humanos no mundo, com o Brasil responsável por mais de 97% dos casos de LV nas américas no ano de 2019 (WHO, 2021).

Conhecida popularmente como calazar (ÁVILA, 2018, WHO, 2021), a leishmaniose é uma zoonose cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania*, o qual, é transmitido através de vetores flebotomíneos da ordem *Diptera*, da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. No Brasil, a LV é endêmica, sendo causada pela espécie *Leishmania infantum*, cujo vetor principal é *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2006; WHO, 2014; SALES et al., 2019; ROCHA et al., 2020). No entanto, há evidências de que outras espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia migonei*, também podem estar envolvidas na disseminação da doença (UBIRAJARA FILHO et al., 2021). Na ausência do flebótomo, o protozoário já foi isolado em ectoparasitos como carrapatos e pulgas de cães domésticos em áreas endêmicas para leishmaniose canina (DANTAS-TORRES et al., 2010).

Embora a LV seja considerada como uma doença típica de áreas rurais, com uma complexa cadeia epidemiológica, tendo na fauna hospedeiros vertebrados definitivos como gambás e outros carnívoros selvagens, tem sido observado nas

últimas décadas uma disseminação de casos de áreas rurais para áreas urbanas (DANTAS-TORRES; BRANDÃO- FILHO, 2006).

Segundo Godoy et al., (2016) o cão nas áreas urbanas é apontado como o principal reservatório doméstico, este fenômeno é referido como “urbanização da leishmania visceral”. A íntima convivência do cão com o homem facilita a propagação da doença, uma vez que o vetor não faz longos voos; desta forma, a proximidade do animal infectado com o humano eleva a probabilidade de transmissão (ÁVILA, 2018).

Cães positivos para LV apresentam sintomatologia variável conforme resposta imunológica individual de cada animal. Os sinais clínicos clássicos da parasitose se expressam em alterações dermatológicas, afecções oftalmológicas, problemas renais e digestórios. Em cães a dermatite esfoliativa ocorre com descamação branca-prateada na região da cabeça, orelhas e extremidades, além de hiperqueratose na região do focinho (CONTRERAS et al., 2019). Sintomas cardiorrespiratórios, musculoesqueléticos e neurológicos também já foram relatados (LARSSON; LUCAS, 2016; NAKKLOUD et al, 2021).

No Brasil, o artigo 3º da resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de maio de 2012 determina condições em que se recomenda a eutanásia de um animal. Em casos de animais acometidos pela leishmaniose, as condições envolvem situações em que o animal não disponha da possibilidade de tratamento, representando riscos à saúde pública. Caso instituída, a eutanásia deve obedecer a resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2006). De acordo com Machado et al., (2016), evidências científicas indicam que a eutanásia não é uma medida eficaz na eliminação da leishmaniose visceral canina, em função de vários fatores, tais como o constante tráfego de animais, falta de controle sobre manejo reprodutivo, o que aumenta o número de cães errantes, além da falta de saneamento básico, que propicia a multiplicação do vetor.

A melhor forma de evitar a leishmaniose ainda é a prevenção, através do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% e desde 2017 é possível tratar a leishmaniose visceral canina com um medicamento específico aprovado para este fim. Atualmente, o único fármaco permitido, no Brasil, como forma de tratamento para cães, é o Milteforan® (Virbac), à base de Miltefosina, de acordo com o boletim técnico

da Virbac® (2017). O diagnóstico deve ser baseado nos dados epidemiológicos e nos sinais clínicos, porém, para diagnóstico confirmatório, devem ser realizados exames laboratoriais, podendo se dar através de parasitológico por pesquisa de amastigota em punções de órgãos linfoides ou os métodos utilizados para confirmação como o ensaio imunoenzimático - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ou ainda o exame molecular - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo este último o mais específico (ALBUQUERQUE; LANGONI, 2018). No Brasil, os testes mais utilizados para o diagnóstico definitivo de leishmaniose visceral canina são a RIFI e o ELISA, sobretudo este último teste é de escolha para inquéritos populacionais. Nos estudos com LV, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também tem sido utilizada com a finalidade de diagnóstico da enfermidade, além disso, a técnica é adotada no monitoramento do tratamento e nos estudos epidemiológicos (GONTIJO; MELO, 2004; BORGES; LIMA, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Adequar o protocolo de reação em cadeia de polimerase (PCR) para diagnóstico de leishmaniose visceral canina no hospital universitário veterinário do centro de ciências agrárias da universidade federal da Paraíba (HUVet - CCA- UFPB)

2.1 Específico

1. Utilizar o diagnóstico molecular como exame confirmatório da leishmaniose em canídeos atendidos HUVet em animais suspeitos de leishmaniose, diminuindo a utilização de técnicas invasivas e dolorosas como PAAF de linfonodo ou medula.

2. Testar a viabilidade do uso de amostras residuais dos exames hematológicos provenientes da rotina hospitalar.

3. Identificar possíveis animais positivos assintomáticos que funcionam como reservatórios da doença.

3 METODOLOGIA

O estudo contou com a aprovação do comitê de ética (CEUA/UFPB), número de protocolo 8313180522, utilizando amostras sanguíneas coletadas aleatoriamente de 50 cães de raças, sexo e idade mistas, atendidos no HUVet, obtidas através da coleta rotineira. Através do exame de punção aspirativa com agulha fina (PAAF) em linfonodo, foi realizada a confirmação parasitológica da amostra-controle utilizada de parâmetro e seus resultados foram comparados aos encontrados no teste de PCR conduzido no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário da UFPB; o material obtido através do PAAF, foi colocado em lâmina de vidro e corado através de panóptico.

Cada amostra continha entre 3 a 5mL de sangue obtido por punção venosa, utilizando agulhas 25x7mm e seringa de 5mL sem anticoagulante, submetido a centrifugação em 800 G durante 5 minutos para obtenção do soro, após o uso das amostras para realização dos exames referentes ao atendimento do paciente pelo HUVet, a parcela restante de soro que serviu ao estudo foi armazenada sob temperatura de -20°C até o momento das análises.

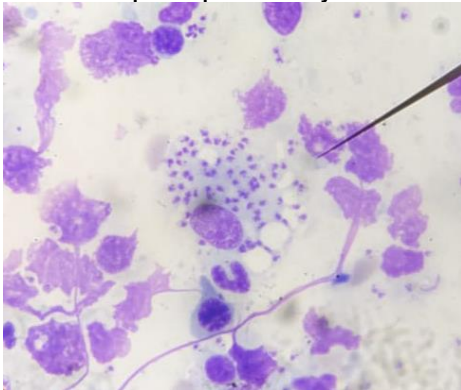
Para o PCR foi extraído DNA a partir das amostras armazenadas utilizando o kit comercial Blood/Tissue DNA Mini Kit (Mebep Bioscience), de acordo com as recomendações do fabricante, logo após foi aferida a concentração de DNA de cada extração e realizada a diluição de cada amostra em uma concentração final de 20 ng/μl, mantidas posteriormente em -20 °C até a realização da reação. Para critérios de comparação, foi realizado o controle positivo por meio de amostra de DNA de um cão positivo no teste de PAAF e o negativo foi realizado substituindo a amostra por água, com intuito de avaliar especificidade de reação e possíveis ocorrências de contaminação. Na mistura do PCR foram adicionados 20 pmol de cada primer (MC1: 5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG; MC2: 5' CACCCATTTTCCGATTTTG), 1X de tampão de PCR (Quatro G), 2 mM de MgCl₂ (Quatro G), 200 μM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Quatro G), 80 ng de DNA genômico (*Leishmania* Spp.) da amostra a ser testada, e H₂O para um volume final de 25 μl, sob as seguintes condições de amplificação: 94°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56 °C do primer por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, um DNA Ladder (100 pares de base – Kasvi) foi adicionado ao gel para servir de padrão para determinar o peso molecular dos produtos. O gel foi visualizado no foto documentador (L-Pix Chemi Molecular Imaging - Loccus Biotec).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

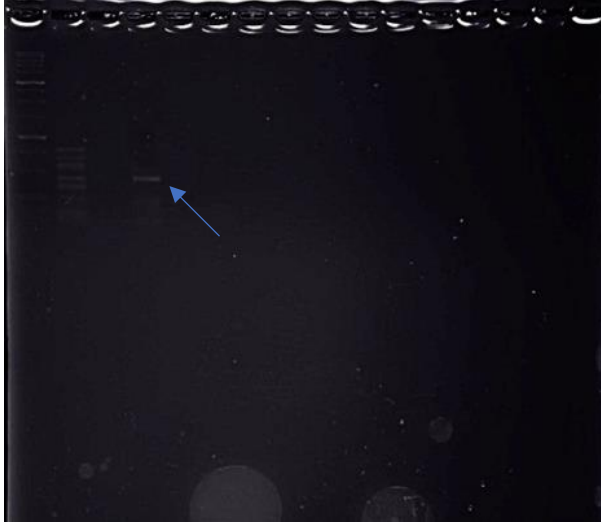
O PCR foi capaz de detectar *Leishmania* Sp. na amostra positiva confirmada por PAAF positivo (Figura A). Assim, o soro obtido da amostra sanguínea coletada durante o atendimento do paciente no HUVet, foi utilizado para padronizar o teste para visualização de uma banda positiva de *Leishmania* (Figura B), obtendo assim, um modelo que serviu como controle para as outras amostras (Figura C e D) desta forma, evitamos múltiplas coletas do paciente comprovadamente positivo ao longo do experimento.

Figura A – PAAF do linfonodo poplíteo de paciente controle atendido no HUVet. Formas amastigotas do protozoário *Leishmania* Sp., coloração de Romanosky, Microscopia optica, obj 100x.



Fonte: Acervo pessoal, 2023

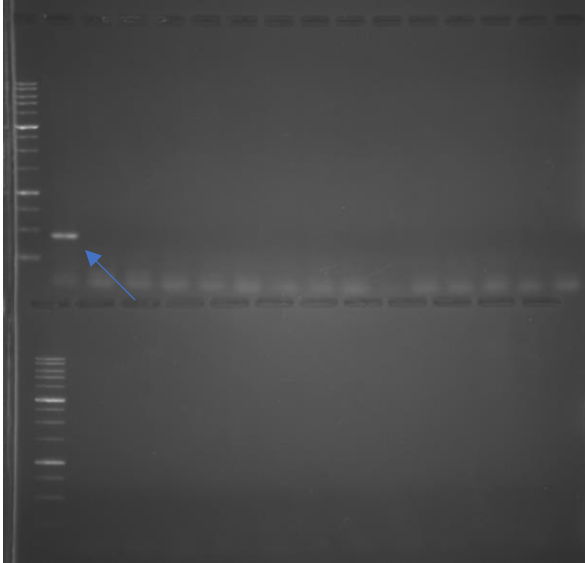
Figura B – Produto de ampliação da amostra DNA positiva de Leishmaniose, utilizada como modelo controle para determinar peso molecular



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

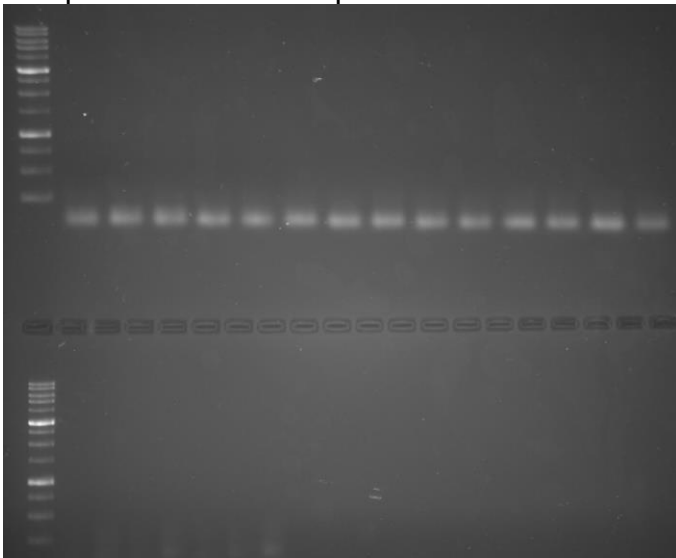
No PCR, podem ocorrer interações de primers entre si, independentes da amostra, dando origem a produtos não-específicos, denominados dímeros de primers ou primers dimers. Como os primers estão presentes em altas concentrações, podem ocorrer essas fracas interações entre eles, que são corriqueiras na rotina de PCR, gerando uma banda de coloração mais fraca fora do ladder (BROWNIE et al.,1997). A amostra 1 (Figura C) demonstrou a banda de peso molecular similar ao modelo controle, as demais amostras demonstram resultados negativos (Figura C e D), onde apenas podemos observar primers dimers; uma boa hipótese para a formação dos primers dimers (Figura C e D), pode ter sido devido à baixa concentração de material genético presente nas amostras utilizadas (Apêndice A).

Figura C - Amostras de DNA de 1 a 32, onde amostra 1 demonstrou material de peso molecular compatível ao controle positivo demonstrado na Figura B.



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Figura D - Amostras de DNA de 33 a 50, nenhuma demonstrou peso molecular compatível ao controle positivo demonstrado na figura A.



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

A Leishmaniose Visceral possui incidência em todo o território nacional, contudo, quando comparados, os estudos que relatam a sua casuística em distintos estados, evidenciam uma variação significativa nos percentuais obtidos. Silva et al (2006 apud ANDRADE, 2019, p. 23), contabilizaram 28,57% (28/98) de animais positivos em Belo Horizonte (MG). Já na região nordeste, Dantas-Torres et al. (2010) observaram 2,43% (1/41) de cães positivos em Exu (PE).

Como enfatiza Marcondes e Rossi (2013), a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina, possui uma variação de 4% a 75%, que pode ser atribuída a fatores regionais e ao próprio método de diagnóstico. Segundo os autores, maioria dos estudos epidemiológicos baseia seus diagnósticos na sorologia, e como alguns animais não realizam a soroconversão, os resultados acabam sendo menores do que realmente são.

Um outro fator contribuinte para a variação na casuística da LV, está relacionado com os índices de introdução de animais errantes infectados em áreas endêmicas (DANTAS-TORRES, 2009). Animais de rua que ficam em contato mais próximo com lixo, áreas escuras e úmidas com matéria orgânica em decomposição, tornam-se mais propensos à picada dos flebotomíneos que se reproduzem e se abrigam nessas áreas, isso somado a uma alta densidade populacional de cães de rua, torna-se um agravante à distribuição da enfermidade (KILLICK-KENDRICK, 1990; FELICIANGELI, 2004).

Os testes de PCR realizados no presente estudo, evidenciou positividade para Leishmaniose em 2% (1 /50) das amostras testadas no HUVet, Areia (PB), denotando, portanto, mais proximidade com os resultados obtidos no estudo realizado por Dantas-Torres et al. (2010) no município de Exu (PE).

A aplicação da técnica na rotina do HUVet promoverá uma amostragem maior de animais, possibilitando uma caracterização do perfil epidemiológico da doença, permitindo estudos futuros de quantificação mais apurados da região de Areia (PB) e regiões contempladas.

4 CONCLUSÃO

Das 50 amostras analisadas, a amostra 1 (Figura C) mostrou resultado positivo quando comparado com a amostra controle (Figura B).

Esse resultado demonstra que o PCR utilizando amostra do soro residual resultante da rotina pode detectar DNA da Leishmania. E poderá ser adotado ao protocolo como exame complementar no HUVet, uma vez a coleta do material necessário para sua realização pode ser obtido juntamente à realização de outros exames de rotina e seu resultado positivo é suficiente para diagnostico confirmatório,

permitindo avaliação de animais assintomáticos, e como alternativa a animais com suspeitas como diagnostico diferencial no lugar de técnicas mais invasivas como a punção aspirativa de linfonodos e medula.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A.L.H.; LANGONI, H. **A prática do tratamento na leishmaniose visceral canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos.** Veterinária e Zootecnia, v.25, n. 1, p. 132-141, 2018.
- ANDRADE, W. W. A. **Caracterização molecular e espacial de cães naturalmente infectados por leishmania spp. no município de Exu, Pernambuco, Brasil.** Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8183>>
- ÁVILA, M.M. **Aspectos da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) e da infecção por Leishmania spp. em cães domésticos em uma área de alta incidência de Leishmaniose Tegumentar em Rio Branco, Acre. 2018.** 100 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio Branco, 2018.
- BORGES, F. S.; LIMA, D. J. S., **Leishmaniose visceral em canino: abordagem diagnóstica e terapêutica convencional associada com a ozonioterapia – Relato de caso.** Pubvet, v.14, n.11, a698, p.1-10, nov., 2020.
- BROWNIE J.; SHAWCROSS S.; THEAKER J.; WHITCOMBE D.; FERRIE R.; NEWTON C.; LITTLE S.; **The elimination of primer-dimer accumulation in PCR, *Nucleic Acids Research***, Volume 25, Issue 16, 1997
- CONTRERAS, I.K.; Machado, M.A.; Rocha, C.O.J.M.; Oliveira, G.R.; Carvalho, F.C.G. **Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras.** PUBVET, v.13, n.4, p.1-6, 2019.
- COUTINHO, M. T; BUENO, L. L; STERZIK, A; FUJIWARA, R. T; BOTELHO, J. R; DE MARIA, M; et. Al., **Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis.** Veterinary parasitology, 128(1-2), 149–155. 2005.
- CFMV, Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Perguntas e Respostas sobre leishmaniose visceral canina (LVC), questões técnicas e legais.** Disponível em: <[http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/07_11_2017_Perguntas%20e%20Respostas%20LVC_%20Atualização%201\(1\).pdf](http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/07_11_2017_Perguntas%20e%20Respostas%20LVC_%20Atualização%201(1).pdf)>. Acesso em: 15 de julho de 2023.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control**. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 48(3), 151– 156. 2006.

DANTAS-TORRES, F. **Canine leishmaniosis in South America**. *Parasites & Vectors*, v. 2, n. 1, 2009. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>>. Acessado em: 12 de junho de 2023.

DANTAS-TORRES, F; LORUSSO, V; TESTINI, G; DE PAIVA-CAVALCANTI, M; FIGUEREDO, L. A; STANNECK, D; MENCKE, N; BRANDÃO-FILHO S. P; ALVES L. C; OTRANTO, D. **Detection of Leishmania infantum in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy**. *Parasitology Research*. 2010 Mar;106(4):857-60. doi: 0.1007/s00436- 010-1722-4. Epub 2010.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, 7(3), 338–349. 2004.

KILLICK-KENDRICK, R. **Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review**. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LARSSON, C.E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. 1ª ed., São Caetano do Sul: Interbook, 2016. 888p. 2016.

MACHADO, C. J. S., SILVA, E. G.; VILANI, R. M. (2016). **O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil**. Saúde e Sociedade, 25(1), 247–258. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902016146918>.

MARCONDES, M.; ROSSE, C. N.; **Leishmaniose visceral no Brasil**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

RIBEIRO, J.B.P.; MIRANDA-VILELA, A.L.; GRAZIANI, D.; GOMES, M.R. A.; et al., **Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania amazonensis in mice**, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 13, p. 282- 290, 2016.

ROCHA, S. T. F; SHIOSI, R. K; FREITAS, A. B. M. **Canine visceral leishmaniasis - literature review / Leishmaniose visceral canina - revisão de literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.; (34): 13 p, jan. 2020.

SALES, K. G. S. et al. **Home sweet home: sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, Where leishmaniasis is endemic.** Parasites & Vectors, v.12, n.118, p.1- 12, 2019.

SILVA, R.; ALMEIDA JÚNIOR, G.S.; CURY, J.R.M.; AMARAL, J.B.; et. Al., **Leucograma de estresse.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n 11, 2008.

SOUZA, Y. C. P.; CARVALHO, A. F.S.; CARVALHO, L. A. R.; MANSUR, V. F. R. **Testes diagnósticos para leishmaniose visceral –atualidade e perspectivas,** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. (2013), jul; N. 21, 2013.

TURATO, E. R. **Métodos qualitativos e quantitativos na área da saúde: definições, diferenças e seus objetos de pesquisa.** Revista de Saúde Pública, v.39, n.3, p.507-514, 2005.

UBIRAJARA FILHO, C. R. C. et al. **Lutzomyia evandroi in a new area of occurrence of leishmaniasis.** Acta Parasitologica, v.65, p.1-8, 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis in the Americas for the General Public; 2014.** Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754 > Acesso em: 15 de julho de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2019). **Leishmaniasis World Health Organization Web.** Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/> Acessado em: 12 de junho de 2023.

APÊNDICE A – CONCENTRAÇÃO EM NG/μL DE DNA DE CADA AMOSTRA UTILIZADA NO ESTUDO.

Amostras	Concentração (ng/μl)
1	132.53
2	4.09
3	0.97
4	3.41
5	45.11
6	1.0
7	61.88
8	70.57
9	1.62
10	23.20
11	3.43
12	2.11
13	6.72
14	4.72
15	8.95
16	5.41
17	0.56
18	3.99
19	2.82
20	2.70
21	4.63
22	6..50
23	2.03
24	1.42
25	18.84
26	4.63
27	9.02
28	0.42
29	12.65

30	1.87
31	5.05
32	12.50
33	1.42
34	1.41
35	1.96
36	0.25
37	0.71
38	2.74
39	1.06
40	2.28
41	0.95
42	0.49
43	2.56
44	0.96
45	7.59
46	1.35
47	3.38
48	45.11
49	32.14
50	54.7

Fonte: Acervo pessoal, 2023.