



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS
- GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA PROFISSIONAL DE SAÚDE
EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CAIO FELIPE CAVALCANTI DE ANDRADE GOMES

**RELATÓRIO DE CONCLUSÃO DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA
PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA - DOENÇAS PARASITÁRIAS**

RECIFE-PE

2021

CAIO FELIPE CAVALCANTI DE ANDRADE GOMES

**RELATÓRIO DE CONCLUSÃO DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA
PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA - DOENÇAS PARASITÁRIAS**

Trabalho de Conclusão de Residência
submetido ao Programa de Residência
Profissional de Saúde em Medicina
Veterinária da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como requisito para a
obtenção de título de Especialização em
Doenças Parasitárias.

Tutor: Leucio Câmara Alves

Preceptor: Leucio Câmara Alves

RECIFE-PE

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
RESIDÊNCIA PROFISSIONAL EM SAÚDE**

**Relatório de conclusão de Residência Profissional em Medicina
Veterinária Preventiva- Doenças Parasitárias elaborado por:
CAIO FELIPE CAVALCANTI DE ANDRADE GOMES**

Aprovado em 25/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE
Tutor

Carlos Adriano de Santana Leal
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Winy Gomes de Oliveira Silva
Médica Veterinária autônoma

**RECIFE-PE
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Caio Felipe Cavalcanti de Andrade
Gomes, Caio Felipe Cavalcanti de Andrade
RELATÓRIO DE CONCLUSÃO DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - DOENÇAS PARASITÁRIAS: Detecção molecular de DNA de Leishmania infantum em saliva em cães (Canis lupus familiaris) de área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil / Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes. - 2021.

38 f. : il.

Orientador: Leucio Camara Alves.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária, Recife, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Parasitologia. 3. PCR. 4. Saúde única. 5. Zoonose. I. Alves, Leucio Camara, orient.
II. Título

CDD 636.089

RESUMO

O objetivo deste relatório é descrever as atividades desenvolvidas durante o período de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE - Medicina Preventiva (Doenças Parasitárias), sendo realizado no período de Março de 2019 e Fevereiro de 2021, concluindo uma carga horária de 5.760 horas, das quais 3.728 horas cumpridas no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos-UFRPE, 480 horas na Vigilância em Saúde (VS), 160 horas no Núcleo Ampliado de Saúde da Família e Atenção Básica (NASF-AB) ambos no município de Camaragibe-PE. Além disso, foi possível desenvolver um trabalho de pesquisa sobre detecção molecular de *Leishmania infantum* em amostras de saliva em cães de área endêmica do estado de Pernambuco.

ABSTRACT

The purpose of this report is to describe the activities carried out during the Residency in Health Professional Area in Veterinary Medicine at the Federal Rural University of Pernambuco State - UFRPE- Preventive Veterinary Medicine (Parasitic Diseases), during the period from March 2018 to February 2020. The weekly workload is 60 hours, totaling 5,760 totaling a workload of 5,760 hours, of which 3728 hours worked at the Laboratory of Parasitic Diseases/UFRPE, 480 hours at Health Surveillance, 160 hours at the Extended Family Health and Primary Care Center both in the city of Camaragibe-PE and 240 hours in the Small Animal's Medical Clinic sector at the Veterinary Hospital-UFRPE. It was developed an experimental research about the molecular detection of *Leishmania infantum* in saliva swabs in dogs that are suspicious and positive for leishmaniasis in the city of Recife-PE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu noivo, Esdras Gueiros, que me deu todo tipo de apoio durante o tempo de residência, te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e todos os orixás que me guiaram por esse caminho, me dando tranquilidade e sabedoria para trilhar esse caminho tão atípico frente a uma pandemia. Obrigado a ancestralidade e toda energia superior a mim. Gratidão a toda família de santo que me deu suporte, em especial ao meu babalorixá Júnior de Ajagunã, e aos meus irmãos Beatriz, Arthur, Rafael, Tainã e Gustavo.

A minha irmã Ana Carolina que tanto fez por mim, e tanto me apoiou, não sei como eu estaria hoje se o seu apoio psicológico e colo confortável. Ao meu pai Wellington e minha mãe Fabiana, vocês também me deram muito suporte, sempre que precisei. Gratidão a toda a família. Tios e tias, primos e primas, avós e avôs. Vocês fazem parte da minha história.

A Esdras, aquele que aturou diariamente minhas preocupações e anseios diários, que me deu amor e conselho quando eu mais precisei, encontrei você e não quero perder nunca mais. Te amo. A minha nova família, minha sogra Rosangela, e meu cunhado Pedro, obrigado por me aceitarem tão bem na família de vocês. São parte de mim.

Samantha e Paula, vocês são irmãs de vida, que eu levo por onde for, não podemos nunca deixar esse sentimento morrer. As primeiras amizades que a medicina veterinária me trouxe e com certeza serão as que levarei ao túmulo, não importa distância, não importa adversidades, são vocês, meus tudos.

A Wedna, te conheço desde sempre, mas desde que me tornei adulto, e vim para Recife, nos tornamos mais próximos, mesmo que não oficialmente, te considero uma madrinha, e foi exatamente isso que você foi nos últimos anos tão difíceis que passei com minha vida pessoal. Obrigado por tudo.

Ao laboratório de doenças parasitárias, por todo o suporte e auxílio nos momentos em que eu estava mais sobrecarregado, em especial a Talita e Lara que dividiram os momentos de residência como, ao professor Leucio por me orientar tão bem durante os últimos quatro anos! Obrigado a todos, em especial a Janilene, Beatriz, Cássia (E Astolfo), Laís, Vanuza, Wanessa, Letícia e Roseane.

Obrigado a vocês, Winny Gomes e Carlos Adriano Santana, por aceitarem fazer parte da minha banca.

Em tempos de pandemia, conheci novas pessoas que foram fundamentais na conclusão da minha residência, Regina, Tamires, Dayane, Mirella, Larissa e

Amanda. Um abraço especial para Natam, um amigo de verdade que a residência me trouxe, obrigado por participar da minha banca, e me orientar tão bem pelos sete meses no NASF-AB. Me apeguei tanto, fui e voltei tantas vezes, que quando fui a última vez, achei que ainda voltaria, senti saudades quando não voltei.

As gerosas que geram, vocês também foram fundamentais com todo o suporte, sinto muitas saudades de cada um de vocês, amo todos: Michel, Taylane, Amanda, Ana Paula, Ayna, Diego, Jade, Júlio, Sam, Willy e Ótávio. Vocês são absolutamente demais.

Lury e Angelo meus irmãos do coração, oito anos de amizade não se constrói de qualquer forma, se constrói com muito amor e reciprocidade, vocês nunca me abandonaram, nós nunca nos abandonamos. Amo vocês.

Aos amigos que ficaram em Caruaru, sinto saudade de todos, queria que pudéssemos nos ver mais vezes, Lyllyan, Hélder, Taires, Monalisa, Nadson, Michael, Larissa e Leo, vocês são demais.

Aos meus r-parça, as minhas meninas R2, que dividiram a residência comigo, obrigado a toda a turma, rimos muito em meio a tanto desespero e pandemia, fizemos piadas e levamos esses dois anos com muita leveza, apesar das dificuldades. Desejo o melhor caminho para cada um de vocês.

A Jaqueline Bianque de Oliveira, que foi minha orientadora por tantos anos da graduação, uma das minhas bases dentro da universidade, obrigado por me ensinar a escrever dentro da vida acadêmica, e por me ensinar a viver fora dela, obrigado por todos os ensinamentos. Senhora não, amiga.

Aos meus pacientes caninos por me permitirem aprender tanto com vocês, aos que estão bem, e aos que estão em um lugar ainda melhor, todo conhecimento adquirido vou levar para a vida.

Ao movimento LGBTQIA+. É necessário a cada dia ter mais orgulho de quem é, e se auto-afirmar sempre. Orgulho por tudo que conquistamos e ainda conquistaremos. Gratidão a todo o movimento que me antecedeu por me permitir chegar tão longe.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS - Agente comunitário de saúde

DMV - Departamento de Medicina Veterinária

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPI - Equipamento de proteção individual

HOVET- Hospital Veterinário

KOH - Hidróxido de Potássio

LDP - Laboratório de Doenças Parasitárias

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MS - Ministério da Saúde

NASF-AB Núcleo Ampliado à Saúde da Família - Atenção básica

OPG - Ovos por gramas de fezes

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

r.p.m.- rotação por minuto

SUS - Sistema Único de Saúde

TR- DPP® - Teste Rápido Dual Path Platform

UBS - Unidade Básica de Saúde

UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco

VS - Vigilância em Saúde

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para *L. infantum*. Amostra Positiva (seta). M: Marcador de peso molecular da marca GeneDirex® concentração 100bp; -: Sem amostra; 32 a 40: Amostras processadas; CP: Controle positivo; CN: Controle Negativo. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parasitos encontrados com respectiva prevalência e espécies animais envolvidas no período de março de 2019 a dezembro de 2020. 21

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - RELATÓRIO DE CONCLUSÃO DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA- MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - DOENÇAS PARASITÁRIAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA RESIDÊNCIA	17
3. ATIVIDADES REALIZADAS	17
3.1. Atividade teóricas	17
3.2. Atividades Práticas	17
3.2.1 Atividades realizadas no LDP	18
3.2.1.1. Pesquisa de Hematozoários	18
3.2.1.2 Pesquisa de microfilárias circulantes	19
3.2.1.3 Exame parasitológico de pele	19
3.2.1.4 Exames coproparasitológicos	20
3.2.1.5 Identificação taxonômica de parasitos	21
3.2.1.6 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina	22
a- Exame parasitológico direto para pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	22
- Biópsia de Medula Óssea	22
- Punção aspirativa com agulha fina - PAAF de linfonodos	23
- Citologia esfoliativa de pele	23
b- Teste imunocromatográfico	23
3.2.1.7 Acompanhamento ambulatorial	24
3.2.2 Atividades em Saúde Pública	24
3.2.2.1. Atividades desenvolvidas na Vigilância em saúde (VS)	24
3.2.2.2. Atividades desenvolvidas no Núcleo Ampliado à Saúde da Família e Atenção Básica (NASF- AB)	25

	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	28
RESUMO	29
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Animais e comissão de ética	31
2.2 Coleta de amostras biológicas	31
2.3 Diagnóstico molecular	31
2.4 Análise de dados	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4. CONCLUSÃO	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

CAPÍTULO I

ATIVIDADES DA RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA

1. INTRODUÇÃO

O Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária instituído no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Campus Recife, é parte da modalidade *Lato Sensu*, sendo instituído, e cumprindo as exigências da portaria Interministerial MEC/MS nº 2117/05. O objetivo do programa, é a especialização de Médicos Veterinários com o treino técnico, visando melhorar as atividades desenvolvidas e oferecidas por estes profissionais para a saúde única.

A especialização tem a duração de 24 meses, com carga horária semanal de 60 horas, sob regime de dedicação exclusiva. Os serviços desenvolvidos são realizados com a supervisão de docentes ou técnicos de nível superior vinculados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET). A carga horária total do programa é de 5.760 horas, sendo divididas em: atividades práticas (80%) e atividades teórico-práticas (20%).

O programa exige ainda em sua carga horária, 960 horas destinadas a trabalhos práticos relacionadas junto à saúde pública, sendo elas realizadas no Município de Camaragibe-PE, atuando tanto na Vigilância em Saúde (720 horas) quanto no Núcleo Ampliado à Saúde da Família - AB (NASF-AB) (240 horas).

O programa de residência em Medicina Veterinária conta com as seguintes áreas: Clínica Médica de Pequenos Animais, Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Anestesiologia de Pequenos Animais, Diagnóstico por Imagem, Clínica Médica, Cirúrgica e da Reprodução de Grandes Animais, Medicina Veterinária Preventiva composta por: Doenças Parasitárias, Víroses, Bacterioses, Saúde Pública, Patologia Clínica Veterinária e Patologia Veterinária.

O presente relatório descreve as atividades referentes a especialização na área de Medicina Veterinária Preventiva no setor de Doenças Parasitárias, sendo realizadas as atividades no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDP), que faz parte do HOVET-UFRPE, estando inserido no Departamento de Medicina Veterinária (DMV-UFRPE). A carga horária exigida pelo Programa de Residência em Área de Saúde em Medicina Veterinária foi desenvolvida durante o período de março de 2019 a fevereiro de 2021, sendo, portanto, o objetivo deste trabalho, relatar as atividades desenvolvidas no período de vivência do programa.

2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA RESIDÊNCIA

O programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária Preventiva, na subárea de Doenças Parasitárias foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDP), que é parte integrante do Hospital Veterinário da UFRPE (HOVET), localizado no Departamento de Medicina Veterinária – DMV da UFRPE, campus Recife, localizada na Rua Dom Manuel de Medeiros no bairro de Dois Irmãos.

O Hospital Veterinário funciona de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 18h, oferecendo à população serviços diversos e gratuitos, contando com os setores citados acima.

As atividades relacionadas à saúde pública foram desenvolvidas no primeiro ano no Município de Camaragibe-PE, na Gerência de Vigilância em Saúde que está localizada na rua Treze de Maio, nº 189 no bairro Timbi. O segundo ano foi desenvolvido no Núcleo Ampliado de Saúde da Família - Atenção Básica (NASF-AB) no Território 1, que é composto por nove Unidades, onde foram acompanhadas as atividades das UBS Vila da Fábrica, Tabatinga Centro, Camará, Borralho, Oitenta, Vila Rica, Asa Branca, São Jorge e Araçá.

3. ATIVIDADES REALIZADAS

3.1. Atividade teórico-práticas

As atividades teórico-práticas correspondem a 20% da carga horária, e são compostas pelas disciplinas obrigatórias ofertadas, que são comuns a todas as áreas e também pelas disciplinas optativas, correspondendo a uma carga horária mínima de 1.152 horas. As disciplinas obrigatórias oferecidas foram: Bioestatística, Bioética e Ética Profissional em Medicina Veterinária, Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Integração Ensino e Pesquisa, Metodologia Científica, Políticas Públicas de Saúde e Seminários de Conclusão de Residência. Foi realizada também a disciplina optativa de Dermatologia de cães e gatos.

3.2. Atividades Práticas

As atividades práticas têm carga horária de 4.842 horas, sendo distribuídas da seguinte forma: 3.728 horas foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos com uma carga horária semanal de 60 horas. Além dessas

atividades práticas, 960 horas foram destinadas à realização das atividades de Vigilância em Saúde e no Núcleo Ampliado de Saúde da Família e Atenção Básica.

3.2.1 Atividades realizadas no LDP

O LDP oferece os seguintes serviços: pesquisa de hemoparasitos, pesquisa de microfilárias circulantes (Knott), exame parasitológico de pele, exames coproparasitológicos (Willis-Mollay, McMaster, Hoffmman, Faust, Baermann e FLOTAC e Mini-FLOTAC), parasitológico de urina, identificação taxonômica e coleta de material biológico para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina além do diagnóstico sorológico. Foram ainda realizadas atividades de pesquisa e extensão contribuindo com os discentes de Mestrado e Doutorado em seus projetos, e auxiliando em aulas práticas de disciplina de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.

3.2.1.1. Pesquisa de Hemoparasitos

A pesquisa de hemoparasitos é realizada através do esfregaço sanguíneo, sendo e é um método específico, mas com baixa sensibilidade. Este exame é bastante utilizado na rotina clínica para a identificação dos seguintes hemoparasitos: *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* (LASTA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2018).

Para a realização do exame utilizam-se amostras de sangue venoso ou periférico armazenadas em tubos plásticos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), as amostras são recebidas no LDP juntamente com a requisição do médico veterinário.

Após o recebimento das amostras enviadas pelos demais setores do Hospital Veterinário, elas são registradas, sendo em seguida confeccionado um esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro para microscopia. O esfregaço é realizado depositando-se uma gota de sangue em lâmina de vidro e em seguida com o auxílio de uma lâmina extensora posicionada num ângulo de 30° a 45° faz-se um movimento contínuo e homogêneo para a frente. Após secagem a lâmina é corada pelo método de panótico rápido e examinada ao microscópio óptico nas objetivas de 40x e 100x para detecção dos hemoparasito.

No período de Março de 2019 a Dezembro de 2020 foram realizados 290 exames de pesquisa de hematozórios, dos quais 25,52% (74/290) foram positivos. Dentre as amostras positivas, em *Anaplasma platys* foi observado em 64,86% (48/74), *Ehrlichia canis* em 4,06% (3/74) e *Hepatozoon canis* em 24,32% (18/74).

3.2.1.2 Pesquisa de Microfilárias circulantes

A pesquisa pela técnica modificada de KNOTT é realizada quando há suspeita de infecção por filarídeos em cães, particularmente *Dirofilaria immitis* e *Acantocheilonema reconditum*, sendo o primeiro de maior importância para a clínica médica de cães e gatos.

A técnica é realizada utilizando 1 ml de sangue periférico em um tubo Falcon de 15ml, adicionando mais 9 ml de água destilada ou formaldeído a 2%, que será responsável pela hemólise, em seguida o tubo Falcon é centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Após este processo o sobrenadante é desprezado sendo adicionado água destilada suficiente para completar 10ml, submetido a centrifugação novamente tendo o sobrenadante mais uma vez desprezado.

Com uso da pipeta, coleta-se 20 µL do precipitado e depositado em lâminas de vidro, e que após homogeneização, são deixadas em repouso para secagem, e em seguida são coradas pelo método de panótico rápido e observadas a ao microscópio óptico no aumento de 10x e 40x para a quantificação e análise morfológica das microfilárias. A leitura é realizada em três lâminas. Para a quantificação das microfilárias, é feito a média aritmética da contagem das três lâminas de vidro, e em seguida multiplica-se o resultado por 50, tendo assim, a média de microfilárias por ml no animal.

Durante o período de março de 2019 a dezembro de 2020 foram encaminhadas ao LDP 152 amostras de sangue para a realização da técnica modificada de KNOTT. Destas, apenas 148 foram analisadas e quatro descartadas em virtude de problemas de conservação e/ou quantidade insuficiente. Das amostras avaliadas, a presença de microfilária circulante foi detectada em 16,22% (24/148).

3.2.1.3 Exame parasitológico de pele

O exame parasitológico de pele faz parte da rotina do clínico de pequenos animais, pois é um exame de fácil realização e de grande valia no diagnóstico de doenças causadas por ácaros. Esse exame pode ser realizado através de raspado cutâneo superficial e profundo, swab auricular, e teste da fita de acetato (MADUREIRA e BRUM, 2017).

O material pode ser coletado de diversas partes do corpo do animal, especialmente nos animais com sinais clínicos, e entre os principais ácaros visualizados através do exame podemos observar *Demodex canis*, *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*, *Lynxacarus radovskyi*, *Otodectes cynotis*, *Psoroptes ovis*, *Knemidocoptes* sp. e *Chorioptes bovis*.

O material é obtido através da escarificação da pele do animal com uso do bisturi, de preferência, deve-se fazer uma dobra na pele e uma compressão para facilitar a saída dos ácaros da pele, o material obtido é depositado em lâminas de vidro e vedado com

esparadrapo ao redor das bordas, sendo em seguida enviado ao LDP juntamente com a requisição do médico veterinário (HAORTA e VAL, 2013).

Dependendo da espécie de ácaro suspeita a técnica de coleta é modificada, por exemplo para a pesquisa de *Otodectes cynotis* a coleta deve ser realizada com swab estéril e o material depositado por rolamento deste em lâmina de vidro, para casos suspeitos de *Lynxacarus radovskyi* a melhor amostra são os pelos do animal, que devem ser removidos e acondicionados entre lâminas de vidro vedadas com fita gomada (HAORTA e VAL, 2013).

Após o recebimento e registro da amostra, a mesma é clarificada com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% ou imersa em óleo mineral, para melhor visualização dos ácaros.

Foram realizados no período de residência 67 exames parasitológicos de pele, dos quais 19,4% (13/67) foram positivos. Dentre as amostras positivas, identificou-se 7,69% (1/13) de *Otodectes cynotis*; 23,08% (3/13) de *Knemidocoptes* sp, e 69,23% (9/13) *Demodex canis*.

3.2.1.4 Exames coproparasitológicos

Diversas técnicas podem ser utilizadas na avaliação parasitológica de fezes, dentre elas pode-se citar a técnica de Willis-Mollay, McMaster, Hoffmman, Faust, Baermann e FLOTAC e Mini-FLOTAC.

Para a análise de fezes de pequenos animais uma técnica bastante empregada é de Willis-Mollay, que consiste em uma flutuação simples, podendo ser realizada com soluções hipersaturadas de açúcar ou sal, que permite a identificação de ovos de helmintos e oocistos de protozoários, esta técnica é considerada qualitativa.

Para a realização da técnica são adicionadas duas gramas de fezes em 25ml de solução hipersaturada de açúcar, que após serem tamisadas são depositada em um tubo de ensaio, no qual é colocado uma lamínula em contato com o menisco formado e depois de 10-20 minutos de repouso é colocada sobre uma lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico no aumento de 10x e 40x.

Para a análise de fezes onde é preciso quantificar os ovos por grama de fezes presentes na amostra, uma técnica bastante utilizada é a de técnica de Gordon & Whitlock, modificada, sendo bastante utilizada para auxiliar o diagnóstico em ruminantes e equinos.

Na rotina do LDP, os exames de eleição para diagnóstico qualitativo e/ou quantitativo são o FLOTAC e o Mini-FLOTAC. O FLOTAC é uma técnica que consiste em flutuação de ovos, após a amostra ter passado por uma centrifugação, ele pode ser usado na identificação de ovos, oocistos, cistos e larvas, podendo também realizar exames de fezes de pequenos animais, ruminantes, equinos e animais silvestres.

Para sua realização são necessárias duas gramas de fezes, que serão homogeneizadas em 18ml de água, tamisadas e divididas em dois tubos Falcon de 15 ml que serão então centrifugados a 1.500rpm por três minutos. Após este processo o sobrenadante deve ser desprezado e o sedimento ressuspendido em seis mililitros de sulfato de zinco ou cloreto de sódio, sendo homogeneizado e o conteúdo deve ser utilizado para preencher a câmara de FLOTAC, que passará por um novo processo de centrifugação de cinco minutos a 1000 rpm, passado esse tempo o material pode ser lido no microscópio óptico em aumento de 10x.

A técnica de Mini-FLOTAC tem como vantagem a fácil realização, pois não precisa de centrifugação. Para sua realização, o fabricante fornece um recipiente próprio (Fill-FLOTAC) onde é colocada a amostra de fezes e acrescentado os 18ml de solução escolhida, Sulfato de Zinco ou Cloreto de Sódio. A amostra é, então, homogeneizada e utilizada para preencher a câmara de Mini-FLOTAC, aguardando-se 10 minutos é possível realizar a rotação da câmara, e a leitura em microscópio óptico no aumento de 10x.

No período de março de 2019 a dezembro de 2020 foram analisadas 175 amostras fecais, sendo que destas 42,86% (75/175) foram positivas, sendo os resultados detalhados na tabela 1 abaixo.

Parasitas encontrados	Prevalência	Porcentagem/Animal
<i>Ancylostoma</i> sp.	44% (33/75)	66,66% (22/33) Caninos 33,33% (11/33) Felinos
Ovos tipo Strongyloidea	26,27% (20/75)	35% (7/20) Ovinos 30% (6/20) Equinos 20% (4/20) Caprinos 15% (3/20) Bubalinos
Oocisto de coccídeo	10,67% (8/75)	50% (4/8) Ovinos 25% (2/8) Caninos 12,5% (1/8) Bubalinos 12,5% (1/8) Caprinos
<i>Toxocara canis</i>	8% (6/75)	100% (6/6) Caninos
<i>Giardia</i> sp.	6,67 (5/75)	100% (5/5) Caninos
<i>Moniezia</i> sp.	2,67% (2/75)	100% (2/2) Bubalinos
<i>Parascaris equorum</i>	1,33% (1/75)	100% (1/1) Equinos

Tabela 1 - Parasitos encontrados com respectiva prevalência e espécies animais envolvidas no período de março de 2019 a dezembro de 2020.

O LDP também realiza exames de animais silvestres e PETS não convencionais, como a Calopsita (*Nymphicus hollandicus*), entretanto, não houveram amostras positivas.

3.2.1.5 Identificação taxonômica de parasitos

Durante o período de março de 2019 a dezembro de 2020 foram recebidas apenas uma amostra para identificação taxonômica, amostra essa de endoparasitas, sendo possível identificar *Parascaris equorum*.

3.2.1.6 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina

Todas as segundas-feiras e quintas-feiras das 8:00h às 12:00h, e nas sextas-feiras das 14:00h às 17:00h o ambulatório de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) funciona para o diagnóstico e acompanhamento de animais provenientes do atendimento do HOVET-UFRPE ou encaminhados de clínicos veterinários externos.

Todos os tutores são submetidos a um questionário epidemiológico, sendo procedido a anamnese e exame físico dos animais. Ainda na primeira consulta para diagnóstico são coletadas amostras para diagnóstico parasitológico direto de medula óssea, coletada a partir do manúbrio do osso esterno e/ou crista ilíaca, de linfonodo por punção aspirativa geralmente a partir do linfonodo poplíteo e citologia esfoliativa de pele e também amostras de sangue para diagnóstico sorológico, e armazenamento de Sangue total e soro.

a- Exame parasitológico direto para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania infantum*

- Biópsia de Medula Óssea

As coletas de medula são realizadas após tricotomia e antissepsia do local de eleição, junto ao manúbrio do esterno ou na região de crista ilíaca. Para realizar a punção são utilizadas seringas de 10 ou 20ml, dependendo do porte do animal e agulhas 40x12. Com o material coletado são realizados squash em lâminas de vidro, que após secagem são fixadas e coradas pelo método de Panótico Rápido e observadas ao microscópio óptico na objetiva de 40x e 100x. Foram realizados 194 exames, sendo que destes 38,14% (74/194) foram positivos para formas amastigotas de *Leishmania* sp.

- Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAFF) de Linfonodos

Um dos sinais mais comuns da LVC é a linfadenomegalia, sendo possível muitas vezes fazer o diagnóstico direto através do material coletado na punção dos linfonodos, sendo realizada principalmente nos linfonodos poplíteos. Após a antissepsia, realiza-se a coleta de material por microcapilaridade através de punção por movimentos em forma de leque, para isso utiliza-se agulha descartável (13x0,45 26g 1/2). Imediatamente após a coleta o material deve ser depositado em lâmina de vidro e distribuído por squash, corado e observado em microscópio óptico no aumento de 40x e 100x.

No período foram realizados 157 exames, sendo 36,31% (57/157) positivos para formas amastigotas de *Leishmania* sp. Além disso, 7,64% (12/157) das amostras coletadas não apresentavam material biológico suficiente, impossibilitando a leitura da lâmina.

- Citologia esfoliativa de pele

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi a pele é friccionada visando esfoliar e remover as células superficiais, o material é também depositado em lâminas de vidro, fixado e corado por Panótico Rápido, visualizado em microscópio óptico no aumento de 40x e 100x.

Foram realizadas 87 coletas das quais 37,93% (33/87) foram positivas. Além dessas amostras, 1,72% (2/116) tinham material biológico insuficiente no momento da leitura da lâmina, impossibilitando o diagnóstico.

b- Teste Imunocromatográfico

Um dos testes mais utilizados na rotina e que também é o recomendado como exame de triagem para diagnóstico da LVC é o Dual Path Platform (TR-DPP®-Leishmaniose Visceral Canina) produzido pela Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. O Teste utiliza uma combinação de proteína A conjugada a ouro coloidal e antígenos recombinantes k28 ligados a uma membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos caninos anti-*Leishmania* (BIOMANGUINHOS, 2011).

A sensibilidade do teste varia entre diversos estudos, sendo encontrados sensibilidade de 57,45% (SILVA *et al.*, 2016) a 98% (GRINALDI, JR. *et al.*, 2012).

Para a realização do teste, 5 µL de soro é adicionado no orifício intitulado Amostra +Tampão , seguido da adição de duas gotas do tampão. Quatro gotas do tampão é adicionado no orifício intitulado tampão após 5 minutos. A leitura dos resultados é

realizada após 10 minutos da colocação das amostras e tampão. Pode ser verificado o aparecimento de uma linha vermelha o qual reflete resultado negativo e o aparecimento de duas linhas vermelhas como resultados positivos.

No período da residência foram realizados 659 testes, dos quais 28,07% (185/659) reagentes para anticorpos IgG anti *Leishmania* sp.

3.2.1.7 Acompanhamento ambulatorial

Após o diagnóstico e esclarecimentos a respeito da doença, os tutores puderam optar por tratar os animais infectados de acordo com os protocolos disponíveis no ambulatório de LVC. Os tratamentos são instituídos de acordo com a legislação vigente e regulamentado por meio de projeto de pesquisa aprovado pela comissão de ética no uso de animais.

Para iniciar o tratamento, os tutores são informados a respeito de custos de tratamento e a necessidade do uso de métodos de repelência e inseticida nos animais, que também devem ser submetidos a exames regularmente como hemograma, bioquímica sérica, ultrassonografia abdominal e urinálise, pois esses resultados irão ser utilizados para estadiar o paciente e instituir o tratamento mais apropriado de acordo com o grau da doença.

Os animais continuam acompanhados periodicamente pela equipe do ambulatório para avaliação clínica e ambulatorial.

3.2.2 Atividades em Saúde Pública

Desde a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 287 de 8 de outubro de 1998, o médico veterinário passou a ser reconhecido como um profissional da área de saúde. Desta forma o Programa de Residência Multiprofissional em Saúde busca habilitar esse profissional para atuar no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2008).

Dentre as atribuições do médico veterinário na saúde pública podemos citar: prevenção e promoção da saúde humana, notificação de agravos, avaliação epidemiológica, controle de zoonoses, inspeção e fiscalização sanitária e educação continuada (TONIN e DEL CARLO, 2016).

3.2.2.1. Atividades desenvolvidas na Vigilância em saúde (VS)

As atividades na Vigilância em Saúde ocorreram no primeiro ano da residência perfazendo uma carga horária de 720 horas, que foram divididas entre as vigilâncias: ambiental, epidemiológica e sanitária.

Durante este período foram desenvolvidas as atividades de vigilância sanitária tais como: visita a estabelecimentos de alimentos, visita a estabelecimentos destinados à prestação de serviços, visitas a estabelecimentos destinados à comercialização de produtos de interesse à saúde; Vigilância epidemiológica: investigação epidemiológica, notificações, participação em campanha de vacinação antirrábica, inquérito de vacinação antirrábica; e atividades de vigilância ambiental: controle de pragas urbanas e investigações de casos de esporotricose. Sendo realizado também atividades de educação permanente em saúde nos espaços citados acima.

3.2.2.2. Atividades desenvolvidas no Núcleo Ampliado à Saúde da Família e Atenção Básica (NASF-AB)

O NASF foi criado a partir da Portaria GM nº 154 de 24 de janeiro de 2008 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), fazendo parte da Atenção Básica e tem por finalidade ampliar as ações da atenção básica, reforçando a territorialização e regionalização das ações, princípios do SUS, fortalecendo as Unidades Básicas de Saúde (UBS). Apesar da atuação fundamental do Médico Veterinário nas ações de promoção à saúde, prevenção e controle de doenças e agravos, este só foi inserido na equipe do NASF-AB no ano 2011 através da Portaria MS/GM nº 2.488, de 21 de outubro de 2011 (BRASIL, 2011; TONIN e DEL CARLO, 2016).

Com a pandemia do novo Coronavírus no ano de 2020, o Hospital Veterinário da UFRPE não abriu entre o período de 16 de março a 30 de novembro de 2020, com isso, os residentes foram redirecionados para o NASF-AB de Camaragibe, as atividades foram desenvolvidas no Território 1, junto ao NASF-AB 1, tendo como sua unidade base a UBS Vila da Fábrica, entretanto, com o tempo, o residente conheceu as 9 unidades de saúde abarcada pelo NASF-AB.

Inicialmente, com a pandemia, o NASF-AB estava com atividades reduzidas, basicamente estavam acontecendo reuniões pontuais para organização interna, recepção dos diversos residentes, e organização para Educação Permanentes em Saúde (EP) nas unidades que estivessem aceitando a recepção do NASF-AB. Nesse período, foi realizado também o curso online da FIOCRUZ sobre o COVID-19.

Houve também convites da secretaria municipal de Camaragibe para que o NASF-AB contribuísse na entrega de máscaras, para estimular a população a usá-las, bem como tirar dúvidas acerca da pandemia, tirando as principais dúvidas e orientando a população a ficar em casa. Distribuimos ainda panfletos informativos, alguns produzidos pelos próprios residentes.

As educações permanentes em saúde foram divididas em 3 reuniões em cada unidade, ambas sobre a pandemia do COVID-19, sendo a primeira uma forma de desabafo para as Agentes Comunitárias de Saúde (ACS) e demais integrantes das unidades, para que digam as principais dificuldades encontradas na pandemia, a segundo sobre o uso correto de Equipamentos de Proteção Individuais (EPI) para evitar a infecção, e finalmente, um levantamento de dados sobre grupos de risco nas comunidades, e como lidar com esses grupos de risco, e orientar sobre o COVID-19.

Em julho, voltaram as discussões de caso, onde uma vez por mês, o NASF-AB se dirigia em todas as unidades de saúde, e faziam um levantamento dos casos mais severos e graves daquela comunidade, e juntos, os diversos profissionais conversavam e resolviam a melhor forma de resolver determinada situação, e quais profissionais poderiam auxiliar no desenrolar do caso.

Junto às discussões de caso, voltaram também os atendimentos domiciliares e individuais, cada grupo de profissional se reuniu e decidiram juntos, qual seria o critério para que esses atendimentos fossem realizados, para a medicina veterinária, era possível um máximo de três atendimentos domiciliares por UBS, sendo realizadas em casas e regiões tidas como grupos de risco para zoonoses como as arboviroses, esporotricose, leishmaniose, leptospirose, presença de animais peçonhentos e venenosos, bem como casa de acumuladores.

No último mês do residente no NASF-AB (Novembro de 2020) começaram a ser retomadas outras atividades, bem como a sua organização, como os programas de saúde nas escolas (PSE), e atividades em grupo (grupos de planejamento familiar), onde mulheres eram chamadas para fazer aplicação do dispositivo intrauterino- DIU, e outras formas contraceptivas para um melhor planejamento familiar, sempre com o acompanhamento da Assistente Social e psicóloga, entretanto, o residente não participou dessas atividades, pois, quando elas iriam iniciar, o Hospital Veterinário da UFRPE reabriu.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C.; SILVA, D.T.; NEVES, M.F. *Dioctophyma renale*: O parasita gigante do rim. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** ANO IV, n 08, jan. 2007. ISSN 1679-7353.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. TR®-DPP Leishmaniose Visceral Canina. Teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para Leishmania. Bio-Manguinhos, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 154, de 24 de janeiro de 2008. Cria os Núcleos de Apoio à Saúde da Família – NASF. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília-DF, 25 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria MS/ GM nº 2.488, de 21 de outubro de 2011. Brasília: Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p.48-55, 24 out. 2011.

CARVALHO, S.M.R. de *et al.* Pesquisa de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em cães assintomáticos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí. **PUBVET** v.12, n.1, a18, p.1-8, 2018.

GRIMALDI JR., G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 106, p. 54-56, 2012.

HAORTA, R.S. e VAL, A.P. C. Exames complementares no diagnóstico dermatológico em Pequenos Animais. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, Dermatologia em Cães e Gatos Nº71**. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG), 2013.

LATTAS, C.S. *et al.* Infecção por *Hepatozoon canis* em canino doméstico na região Sul do Brasil confirmada por técnicas moleculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p.2135- 2140, 2009.

MADUREIRA, R.; BRUM, J. DIAGNÓSTICO DERMATOLÓGICO EM PEQUENOS ANIMAIS: O QUE PODE INFLUENCIAR? **Archives of Veterinary Science**, [S.l.], v. 22, n. 4, 2017.

SILVA, R. B.S *et al.* 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

SOUZA, V.R.F. *et al.* 2009. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n.3, p. 281-283, 2009.

TONIN, F.; DEL CARLO, R.J. Tem Médico Veterinário na Saúde da Família. **Revista CFMV**. Ano XXII nº 69, 2016.

CAPÍTULO II

Detecção molecular de *Leishmania infantum* em amostras de saliva em cães (*Canis lupus familiaris*) de área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil

Detecção molecular de DNA de *Leishmania infantum* em saliva em cães (*Canis lupus familiaris*) de área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil

Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA in saliva of dogs (*Canis lupus familiaris*) from endemic area of Pernambuco State, Brazil

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma enfermidade imunomediada e sistêmica, causada por protozoários das espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. Apesar das diversas opções para detectar a presença da doença canina, o diagnóstico da LVC ainda continua sendo um desafio para o médico veterinário em função da sensibilidade e especificidade dos testes e da alta invasividade dos exames. O objetivo deste trabalho foi a detecção molecular de *Leishmania infantum* em saliva de cães de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco. Foram utilizados 40 cães domiciliados, com idades, raças e sexos variados, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da UFRPE no período de 2019 a 2021. Para a coleta dos fluidos salivares dos animais, foram utilizados *Swab* estéril, sendo então armazenados a 20°C até o posterior processamento por reação em cadeia da polimerase. Dentre as amostras analisadas, foi observada a presença de amostras positivas em 2,5% (1/40). Com o trabalho, conclui-se que o diagnóstico molecular da LVC com uso do *Swab* salivar, é prático, e de fácil execução e pode ter valor diagnóstico.

Palavras-chave: Leishmaniose, Parasitologia, PCR, saúde única, zoonose

ABSTRACT

The canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is an immune-mediated and systemic disease, caused by protozoa of the species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. Despite the various options for detecting the presence of canine disease, the diagnosis of CVL is still a challenge for the veterinarian due to the sensitivity and specificity of the tests and the also by the invasiveness. The objective of this work was the molecular detection of *Leishmania infantum* in the saliva of dogs from endemic areas of the State of Pernambuco.. The saliva collection was conducted from 40 privately-owned dogs with different age, race and gender, attended at the Veterinary Hospital of UFRPE in the 2019-2021 period Saliva samples were stored at 20°C until further processing by PCR. Among the analyzed controllers, a positive presence was observed in 2.5% (1/40). With the work, it is concluded that the molecular diagnosis of CVL with the use of salivary swab, is practical, easy to perform and can have diagnostic value.

Keywords: Leishmaniasis, parasitology, PCR, one health, zoonosis

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma enfermidade imunomediada e sistêmica causada por protozoários da Ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo as principais espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (JAIN e JAIN, 2015). Em áreas endêmicas, a prevalência da doença pode ter uma variação de 4,9 a 67% (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005; COURA-VITAL *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2014), a depender da técnica escolhida para diagnóstico.

No Brasil, o cão (*Canis lupus familiaris*) tem função importantíssima na manutenção da leishmaniose visceral em áreas urbanas, sendo por isso, considerado, como o principal reservatório urbano. Do ponto de vista epidemiológico, a LVC é também de grande importância, uma vez que a doença nos cães precede a enfermidade em humanos (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996; MICHALSKY *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2013).

A Leishmaniose Visceral (LV) é transmitida no Brasil, através da picada das fêmeas de insetos flebotomíneos, da espécie *Lutzomyia longipalpis* infectados com *Leishmania* spp (BRASIL, 2010).

A persistência da infecção, e as complexas interações existentes entre parasito x hospedeiro, pode gerar ou não o aparecimento dos sinais clínicos (FOGLIA-MANZILLO *et al.*, 2013, BELO *et al.*, 2013), notadamente manifestações dermatológicas, renais, hepatoesplênicas, locomotoras, oculares, neurológicas, pulmonares, cardíacas e hematológicas, além de onicogribose e linfadenomegalia (REIS *et al.*, 2006a; SILVA *et al.*, 2017; TRAVI *et al.*, 2018).

Dentre as formas de diagnóstico da LVC, o teste “padrão ouro” é a detecção de formas amastigota de *Leishmania* sp através de punção aspirativa da medula óssea, linfonodos, baço, fígado, além da citologia esfoliativa da pele íntegra e/ou lesionada (MOREIRA, 2002; GOMIDE, 2005). Contudo esses exames apresentam alta especificidade, porém, possuem baixa sensibilidade (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Entre os métodos sorológicos destaca-se o teste imunocromatográfico DPP® Leishmaniose Visceral Canina (GRIMALDI *et al.*, 2012b; LAURENTI *et al.*, 2014), que tem sido usado como triagem e a reação imunoenzimática (ELISA) como teste confirmatório (BRASIL, 2011; COURA-VITAL, 2014).

Outra alternativa, que pode ser somada ao diagnóstico parasitológico/sorológico é o diagnóstico molecular, que visa detectar o DNA de *Leishmania* spp nas amostras

clínicas coletadas, visando a amplificação *in vitro* das sequências de nucleotídeos do parasito.

Apesar das diversas opções para detectar a presença da doença canina, o diagnóstico da LVC ainda continua sendo um desafio para o médico veterinário em função da sensibilidade e especificidade dos testes e da invasividade dos exames, sendo de importante uso em casos de animais agitados, agressivos e difíceis de conter, que dificulta a coleta de materiais biológicos mais invasivas.

Técnicas não invasivas, têm sido desenvolvidas para o diagnóstico da LVC usando amostras de urina, *swab* conjuntival e saliva, apresentando sensibilidade variável na dependência da técnica e amostra utilizada (STRAUSS-AVALI *et al.*, 2004; PILATTI *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2010; CANTOS-BAREDA *et al.*, 2020).

O uso da saliva para o diagnóstico da LVC apresenta essa vantagem de ser uma coleta não invasiva, e causar menor estresse para os cães, além da baixa complexidade da técnica de coleta, fácil armazenamento e transporte, e baixo custo (YOSHIZAWA *et al.*, 2013; FERRAZ, 2016).

Tendo em vista a casuística da doença canina no ambulatório da UFRPE e a necessidade de maximizar métodos de diagnóstico menos invasivo, o objetivo deste trabalho foi a detecção molecular de *Leishmania infantum* em amostras em saliva de cães procedentes de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e comissão de Ética

Foram utilizados 40 cães domiciliados, com idade, raça e sexo variados, atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da UFRPE no período de 2019 a 2021. Todos os cães foram avaliados para a presença de sinais clínicos associados a presença por *L. infantum* e o diagnóstico da foi determinada pela pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp através de biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodos, citologia esfoliativa de pele, aliado a sorologia.

Os tutores dos cães foram informados dos procedimentos a serem realizados, por meio da assinatura de um termo de consentimento da pesquisa. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) registrado sob o protocolo de número 8709220520.

2.2 Coleta de Amostras biológicas

Para a coleta do fluido salivar dos animais, foram utilizados *swabs* de haste plástica estéril, que foram introduzidos na cavidade oral dos animais, sendo então rotacionados em diferentes regiões da boca, principalmente na região do masseter, estimulando a salivação.

2.3 Diagnóstico molecular

O DNA genômico foi extraído a partir das amostras de *swab* conjuntival através do kit da PROMEGA®, de acordo com as instruções do fabricante. A detecção de kDNA de *L. infantum* será realizada utilizando-se os primers MC1 (5'GGT AGC CGA TGG TGG TCT TG-3') e MC2 (5'-CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG-3') que permite a amplificação de 447 pares de bases de DNA (Cortes *et al.* 2004).

2.4 Análise de dados

Para a análise dos dados utilizou-se estatística simples, com o uso do cálculo de porcentagem para determinar a prevalência da leishmaniose para esse método diagnóstico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total, de animais examinados, apenas 10% (4/40) eram assintomáticos e 90% (36/40) apresentavam sinais sugestivos de leishmaniose visceral, particularmente alterações dermatológicas, oculares, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia, sinais estes, compatíveis com aqueles sinais descritos por Reis *et al.*, (2006a); Silva *et al.*, (2017) e Travi *et al.*, (2018).

Todos os cães utilizados na pesquisa foram positivos em diagnóstico parasitológico direto, sendo 77,5% (31/40) positivos pelo método de punção aspirativa de medula óssea; 42,5% (17/40) positivos por punção aspirativa com agulha fina - PAAF de linfonodos; e 17,5% (7/40) positivas com a citologia esfoliativa da pele, sendo que alguns animais foram positivos em mais de uma técnica.

O exame parasitológico direto (padrão-ouro) é altamente específico, podendo chegar a 100%, entretanto a sensibilidade é variável, uma vez que a distribuição tecidual não é homogênea (FARIA e ANDRADE, 2012).

A coleta do fluido salivar foi de fácil execução, armazenamento e posterior processamento. A utilização da saliva como amostra biológica para o diagnóstico da LVC apresenta vantagens como a coleta não invasiva, a diminuição do estresse para os cães e a baixa complexidade da técnica de coleta, fácil armazenamento e transporte, além de baixo custo (YOSHIZAWA *et al.*, 2013; FERRAZ, 2016).

Após a amplificação das amostras do fluido salivar foi possível observar a presença da banda de 447 pares de bases em 2,5% (1/40) do material coletado ([Figura 1](#)).

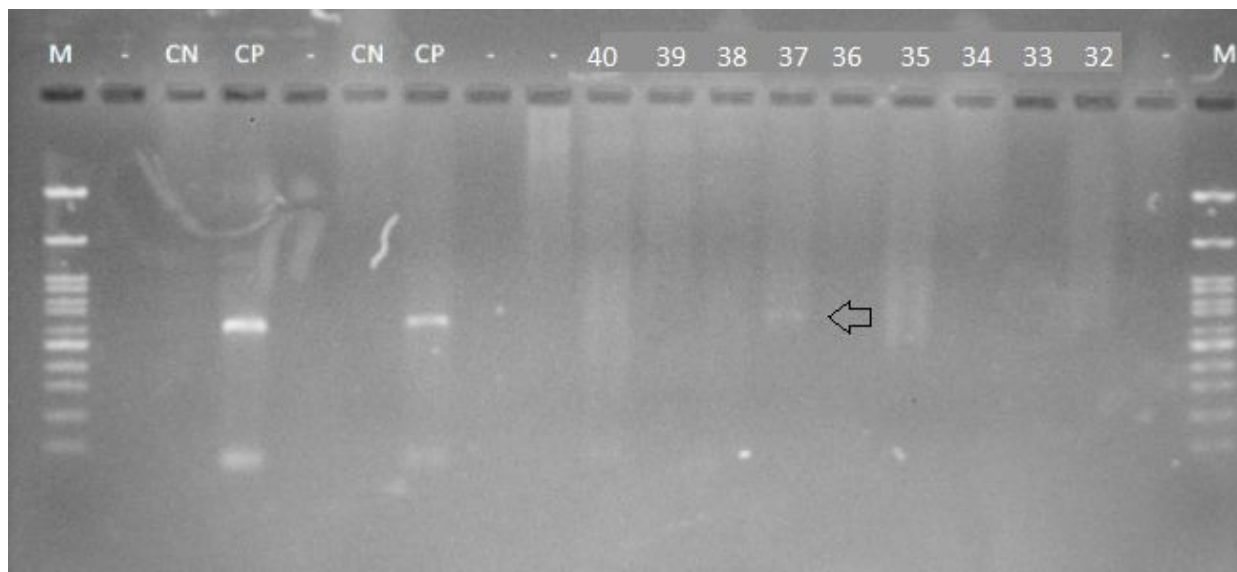


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para *L. infantum*. Amostra Positiva (seta). M: Marcador de peso molecular da marca GeneDirex® concentração 100bp; -: Sem amostra; 32 a 40: Amostras processadas; CP: Controle positivo; CN: Controle Negativo.

O animal positivo na PCR era sintomático, apresentando sinais como úlceras e nódulos na pele, onicogribose e linfadenomegalia, além de ser-parasitologicamente positivo para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp na citologia esfoliativa da pele e punção aspirativa da medula óssea.

Os resultados aqui encontrados corroboram com Lombardo *et al.* (2012) que demonstraram pela primeira vez DNA de *Leishmania* sp na mucosa oral de cães e posteriormente Ferreira *et al.* (2013) demonstrou a utilização da saliva como meio de diagnóstico em animais com sinais clínicos de LVC.

Apesar da detecção do DNA *Leishmania* sp no presente estudo, os dados aqui encontrados foram inferiores aos relatados por Lombardo *et al.* (2012) que observaram a 8,7% e Cantos-Barreda, (2020) que detectaram de 41,7% de positividade nas amostras de saliva examinadas através da utilização de qPCR em tempo real.

A diferença entre os resultados pode ser devido a técnica utilizada em função de que a PCR tradicional é um método que se destaca em sensibilidade e especificidade, enquanto a qPCR é capaz de detectar limites baixos da carga parasitária como 0.001 parasito por reação (FARAUT, LASCOMBE e DUMON, 2004).

Um outro ponto importante que deve ser levado em consideração é o desconhecimento da carga parasitária em diferentes fases da infecção, que pode influenciar a detecção de DNA de *Leishmania* sp na saliva.

Por outro lado, o encontro de DNA de *Leishmania* sp na saliva chama atenção para-a possibilidade da transmissão direta, cão a cão, através da mordedura por exemplo, hipótese já levantada por diversos autores (LOMBARDO, 2012; FERRAZ, 2016).

4. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, conclui-se que o diagnóstico molecular da LVC com uso do *Swab* salivar, é prático, e de fácil execução e pode ter valor diagnóstico. Sugere-se novos estudos, com realização da PCR tradicional e da qPCR para validar *swab* salivar como meio de diagnóstico da LVC.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D., Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997, **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S.; SIMÕES, T.C.; NASCIMENTO, B.W.L.; SILVA, E.D.; STRUCHINER, C.J. Factors associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.4, p.1-11, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Brasília /DF. 8.^a ed. p.277-283. 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina; **Nota técnica conjunta nu 01/2011** - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. 2011.

BRITO, M.E.F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, 2018.

CANTOS-BARREDA, A., Damián E., Padet S., José J. Cerón, M. Carmen T., Raquel N. Afonso-Lehmann, Manuel C.L., Luis J.B., Atchara P., George L., Silvia M.S., Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in saliva of dogs, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, V. 73. 2020.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L.; MORAIS, M.H.F.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-10, 2011.

Coura-Vital W., Ker H.G., Roatt B.M., Aguiar-Soares R.D., Leal G.G., Moreira N.D., *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**. v. 9, n.3, e91009, 2014.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FRAGA D.B., Solca M.S., Silva V.M., Borja L.S., Nascimento E.G., Oliveira G.G.S., Pontes-de-Carvalho L.C., Veras P.S.T., dos-Santos W.L.C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**. v. 190, p. 591– 594. 2012

FERRAZ, M.A. Desempenho do swab oral no diagnóstico molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2016.

Ferreira S. de A., Almeida G.G., Silva S. de O., Vogas G.P., Fujiwara R.T., de Andrade A.S., Melo M.N. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 7, n. 4, e2150. 2013.

FOGLIA-MANZILLO, V.; DI MUCCIO, T.; CAPIELLO, S.; SCALONE, A.; PAPPARONE, R.; FIORENTINO, E.; GIZZARELLI, M.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7 n.5, 2013.

FRANÇA-SILVA, João C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis, **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GRIMALDI G.J., Teva A., Ferreira A.L., dos Santos C.B., Pinto I.D., de-Azevedo C.T., Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 106, n1, p.54-59. 2012

GRIMALDI G.J., Tesh R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 6, p. 230–250. 2013.

GOMIDE, A.P.; Leishmaniose visceral canina: Reflexões sobre a opção do tratamento. Monografia. **Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais**. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, 2005.

JAIN, K.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**, v.422, p.1-12, 2015.

LAURENTI M.D., de Santana Leandro M.V. Jr, Tomokane T.Y., De Lucca H.R., Aschar M., Souza C.S., Silva R.M., Marcondes M., da Matta V.L. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 205, n. 3-4, p. 444-450, 2014.

LEITE, R.S.; FERREIRA, S.D.; ITUASSU, L.T.; MELO, M.N.; ANDRADE, A.S. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n.3-4, p. 201–206, 2010.

LOMBARDO, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n.1, p. 10–17.

LOPES, P.M.; SORTE, E.C.B.; GASPARETTO, N.D.; OLIVEIRA, C.M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 791-795, 2014.

Mary C., Faraut F., Lascombe L., Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 11, p. 5249-5255. 2004.

MICHALSKY E.M., Rocha M.F., da Rocha Lima A.C., França-Silva J.C., Pires M.Q., Oliveira F.S., Pacheco R.S., dos Santos S.L., Barata R.A., Romanha A.J., Fortes-Dias C.L., Dias E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**. v. 147, n. 1-2, p. 67-76. 2007.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S.; Leishmaniose visceral: estudo de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of

- canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39,n.2. p.103-6. 2002.
- MOREIRA M.A., Luvizotto M.C., Garcia J.F., Corbett C.E., Laurenti M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**. v. 145, n. 3-4, p. 245,252. 2007.
- PARANHOS-SILVA M, Freitas L.A., Santos W.C., Grimaldi G. J., Pontes-de-Carvalho L.C., Oliveira-dos-Santos A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 55, n. 1, p. 39-44. 1996.
- PEREIRA M.R., Rocha-Silva F., Graciele-Melo C., Lafuente C.R., Magalhães T., Caligorie R.B. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Biomed Research International**. v.2014. 2014.
- PILATTI, M.M.; FERREIRA, S.A.; MELO, M.N.; ANDRADE, A.S.R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 255–257, 2009.
- PINNA PARPAGLIA, Maria L., *et al.* Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 54, n. 8, p. 414-417, 2007.
- RAMOS R.A., Ramos C.A., Jusi M.M., de Araújo F.R., Machado R.Z., Faustino M.A., Alves L.C. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum* chagasi in dogs. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 21, n.3, p. 192-195, 2012.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.
- REIS L.E., Coura-Vital W., Roatt B.M., Bouillet L.É., Ker H.G., Fortes de Brito R.C., Resende D. de M., Carneiro M., Giunchetti R.C., Marques M.J., Carneiro C.M., Reis A.B. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**. v. 197, n. 3-4, p. 498-503. 2013.
- SILVA, L.A.M.T. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. 86f. 2017. **Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz**, Recife – PE, 2017.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729–1733. 2004.

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-13, 2018.

VIEGAS, C. *et al.* Tongue nodules in canine leishmaniosis—a case report. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2012.

XAVIER, S.C. *et al.* Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2006.

YOSHIZAWA, J.M. *et al.* Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.781-91, 2013