

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CiPharma
Laboratório de Pesquisas Clínicas – LPC

**Detecção de *Leishmania* por PCR e suas
variações (*seminested* PCR e PCR em tempo
real), em fragmentos de pele e de baço de cães
com leishmaniose visceral**

LEVI EDUARDO SOARES REIS

Ouro Preto - MG
Abril de 2013

LEVI EDUARDO SOARES REIS

**Detecção de *Leishmania* por PCR e suas
variações (*seminested* PCR e PCR em tempo
real), em fragmentos de pele e de baço de cães
com leishmaniose visceral**

Orientador: *Dr. Alexandre Barbosa Reis* – Laboratório de Pesquisas Clínicas, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto.

Co-orientador: *Dr. Wendel Coura Vital* – Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Ouro Preto – MG
Abril de 2013**

R375d **Reis, Levi Eduardo Soares.**

Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (*seminested* PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele e de baço de cães com leishmaniose visceral [manuscrito] / Levi Eduardo Soares Reis. - 2013. v, 82f.: il. color.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.
Coorientador: Prof. Dr. Wendel Coura Vital.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

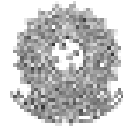
1. Leishmania - Teses. 2. Diagnóstico molecular - Teses. 3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) - Teses. 4. Pele - Teses. 5. Baço - Teses. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Vital, Wendel Coura. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161:616.07



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 67ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a LEVI EDUARDO SOARES REIS com a defesa da dissertação intitulada: "Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (*Seminested* PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele e de baço de cães com Leishmaniose Visceral", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 11 de abril de 2013.

Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
DECBI/UFOP

Prof. Dr. Hêlida Monteiro de Andrade
ICB/UFMG

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
DEACL/UFOP

Colaboradores:

Dra. Mariângela Carneiro (UFMG/MG)

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFMG/MG)

Dr. Marcos José Marques (UNIFAL/MG)

Dra. Cláudia Martins Carneiro (UFOP/MG)

Dra. Daniela de Melo Resende (UFOP/MG)

Dra. Leoneide Érica Maduro Bouillet (UFOP/MG)

Ms. Bruno Mendes Roatt (UFOP/MG)

Ms. Henrique Gama Ker (UFOP/MG)

Instituições Parcerias:

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Alfenas

Suporte Financeiro:

CNPq - Ed. Universal (472554/2007-7)

FAPEMIG - Ed. Universal (CBB - APQ-3073-4.01/07)

DECIT/MS/CNPq/BR/ - (576062/2008-1)

PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG

A Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho, iluminando meu caminho e dando forças para sempre seguir em frente.

A minha família, em especial a meus pais Moacyr e Cida, e a minha irmã Fran e aos demais irmãos, pelo apoio em todos os momentos, pela construção da minha formação pessoal e pela presença constante apesar da distância. Pelo amor imensurável e exemplos de honestidade e caráter, dos quais sempre procurei espelhar-me.

Ao meu orientador Alexandre Barbosa Reis, por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada em mim para conclusão desse projeto. Pelas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

Ao meu co-orientador e amigo Wendel Coura Vital, pela ajuda desde o início do projeto. Por ter me ensinado e possibilitado o primeiro contato com as técnicas moleculares, pela paciência e disposição em compartilhar suas experiências profissionais. Minha admiração pela dedicação ao mundo científico e gratidão aos conselhos e ensinamentos.

A professora Cláudia pelo exemplo de profissionalismo e pelas oportunidades desde a época do PET-Farmácia, me incentivando e apoiando.

A Dra. Leoneide Maduro Bouillet que me auxiliou muito nas técnicas moleculares, nas sugestões e entendimento dos resultados. Muito obrigado pela disponibilidade e ajuda em diferentes momentos deste trabalho.

A Dra. Mariângela Carneiro, pelo apoio que sempre nos oferece, fundamental ao crescimento e amadurecimento de nossa linha de pesquisa.

A Dra. Daniela de Melo Resende, pelo inegável apoio em várias etapas deste trabalho.

Ao Dr. Marcos José Marques, pela oportunidade de aprendizado da técnica de snPCR e pela preciosa colaboração.

Ao Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pela colaboração durante as necropsias dos cães.

Ao Ms. Bruno e ao Ms. Henrique, pelo apoio em várias etapas deste trabalho e pelo convívio e troca de experiências.

Aos amigos Fernando e Jamille, pelos anos de convivência desde a iniciação científica até o mestrado.

Aos alunos do LIMP e do LPC, pelas incontáveis atividades realizadas. Agradeço a todos vocês principalmente pelo companheirismo e constante apoio.

Aos amigos da Pós-Graduação: Bruna, Glaucia, Flávia, Rory, Juliana, Dani e Gleise.

Aos amigos da República Copo Sujo, por fazerem parte da minha formação e vivência durante a graduação e mestrado em Ouro Preto. Ao irmão e amigo Felipe (Furado), por me ensinar a encarar os desafios com bom-humor e ser um grande exemplo de amizade, coragem e determinação. Ao Nardoni, por estar sempre presente, como grande verdadeiro amigo e irmão. Ao Kvra pela consultoria na área de informática em vários momentos.

À Mirela pela presteza e precisão nos serviços da secretaria do programa de Pós-Graduação.

Aos docentes e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos e convivência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 O cão no contexto da Leishmaniose Visceral	6
2.2 Medidas de controle da LVC	7
2.3 Diagnóstico da LVC	10
3. JUSTIFICATIVA.....	16
3.1 Justificativa e relevância.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo Geral:	19
4.2 Objetivos Específicos:	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1 Animais.....	21
5.2 Caracterização clínica dos animais	21
5.3 Obtenção das amostras biológicas	22
5.4 Diagnóstico parasitológico (padrão ouro).....	22
5.4.1 Isolamento do parasito	22
5.4.2 Exame direto em esfregaços.....	23
5.5 Diagnóstico Molecular.....	23
5.5.1 Extração de DNA	23
5.5.2 Iniciadores utilizados nas técnicas moleculares	24
5.5.3 PCR convencional (PCRc).....	25
5.5.3.1 Análise dos produtos da PCR convencional	25
5.5.4 PCR em Tempo Real (qPCR)	25
5.5.4.1 Clonagem	25
5.5.4.2 Preparo de bactérias competentes	26
5.5.4.3 Transformação bacteriana	26
5.5.4.4 Purificação de DNA plasmidial.....	27
5.5.4.5 Construção de curvas-padrão para a PCR em tempo real	28
5.5.5 <i>Seminested</i> PCR (snPCR).....	31
5.5.6 Análises estatísticas.....	32
6. RESULTADOS	33
6.1 PCRc e snPCR para o gênero <i>Leishmania</i>	34

6.2 Avaliação comparativa do potencial diagnóstico de métodos moleculares na LVC em amostra de pele e de baço	35
6.3 Avaliação do desempenho dos métodos moleculares.....	37
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÃO.....	52
9. REFERÊNCIAS	54

Figura 1: Fotografia representativa de cães naturalmente infectados, considerando a forma clínica.....	22
Figura 2: Curvas de dissociação de amostras de pele de cães naturalmente infectados.	30
Figura 3: Curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de <i>L. infantum</i> no sistema SYBR [®] -Green.....	31
Figura 4: Produtos da PCRc de pele e baço de cão naturalmente infectado.	34
Figura 5: Produtos da snPCR de pele de cães naturalmente infectado.....	35

Tabela 1: Oligonucleotídeos empregados nas técnicas moleculares..... 24

Tabela 2: Potencial diagnóstico de métodos moleculares em amostra de pele de cães naturalmente infectados apresentando diferentes formas clínicas..... 36

Tabela 3: Potencial diagnóstico de métodos moleculares na LVC em amostras de baço, e de testes parasitológicos em cães naturalmente infectados apresentando diferentes formas clínicas..... 37

Tabela 4: Positividade total de pele e de baço pelos métodos moleculares. 37

Tabela 5: Análises do desempenho dos métodos moleculares 39

CA – Cães assintomáticos
CCZ - Centro de controle de zoonoses
CO – Cães oligossintomáticos
CS – Cães sintomáticos
Ct - *Ciclo Threshold*
DAT - *Direct Agglutination Test*
DENERu - Departamento Nacional de Endemias Rurais
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DPP - *Dual-Path Platform*
EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA - teste imunoenzimático
FAST - *Fast agglutination screening teste*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
G3PDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IDA - *Immunodiffusion assay*
kDNA - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
LDU - *Leishman Donovan Units*
LIT - *Liver Infusion Tryptose*
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
LVH - Leishmaniose visceral humana
LZOON - Laboratório de Zoonoses
NNN - *Nicole, Novy & Neal*
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PVC-LV - Programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral
qPCR – PCR em tempo real
RIFI - Reação de imunofluorescência indireta
snPCR – *seminested PCR*
SRD - Sem raça definida
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto
UNIFAL - Universidade Federal de Alfenas

RESUMO

A detecção do DNA de *Leishmania* spp, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, surgem como alternativas para o diagnóstico da LVC, por serem métodos altamente sensíveis e específicos. O objetivo deste trabalho foi comparar a PCR e suas variações (*Seminested* PCR e PCR em tempo real) utilizando amostras de pele e de baço de 60 cães soropositivos (RIFI e ELISA). Os animais foram agrupados considerando a forma clínica, sendo classificados como assintomáticos (CA; n=20), oligossintomáticos (CO; n= 22) e sintomáticos (CS; n= 18). Como controle negativo, foram utilizados fragmentos de três cães não infectados provenientes do canil da UFOP. O diagnóstico parasitológico, utilizado como padrão ouro, foi realizado por meio de duas metodologias: cultivo de aspirado medular em meio de cultura NNN/LIT e pela visualização direta de formas amastigotas do parasito em lâminas com *imprints* de pele e de baço. As análises moleculares foram realizadas utilizando iniciadores direcionados para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* – L150/L152 e LINR4/LIN17/LIN19 para as técnicas de PCRc e snPCR, respectivamente. Na qPCR foram utilizados iniciadores que amplificam o gene da DNA polimerase (DNA pol α) de *L. infantum*. De acordo com os testes parasitológicos 61,7% das amostras foram positivas. Nos fragmentos de pele, a sensibilidade da PCRc foi de 89,2%, já para a snPCR e qPCR foi de 86,5% e 97,3% respectivamente. VPP para a PCRc foi de 36,0%, snPCR de 35,3% e da qPCR foi 38,1%. O VPN foi de 93,6%, 92,1% e 98,3% pelas técnicas de PCRc, snPCR e qPCR respectivamente. Em amostras de baço, a sensibilidade da PCRc foi 81,1%, snPCR de 94,6% e de 100,0% pela qPCR. O VPP para a PCRc foi 33,9%, snPCR 37,4% e qPCR 38,7%. O VPN da PCRc foi de 89,3%, snPCR 96,7% e qPCR 100,0%. A positividade nos testes moleculares aumentou de acordo com a gravidade dos sinais clínicos. Foi observado que a qPCR apresentou os melhores resultados na pele e no baço devido a maior sensibilidade, VPP e VPN, em comparação as outras técnicas moleculares. Sendo assim, concluímos que a melhor técnica e tecido para o diagnóstico molecular da LVC é a qPCR de pele, devido à elevada sensibilidade e fácil obtenção da amostra biológica.

Palavras chave: *Leishmania*. Diagnóstico molecular. PCR. qPCR. snPCR. Pele. Baço. Leishmaniose Visceral Canina.

ABSTRACT

The detection of *Leishmania* DNA based on polymerase chain reaction (PCR) and its variations represent alternatives for CVL diagnosis with highly sensitive and specific methods. The aim of this work was to compare the PCR and its variations (*Seminested* PCR and quantitative PCR) in samples of skin and spleen of 60 seropositive dogs (IFAT and ELISA). The animals were divided according to their clinical presentation and were classified as asymptomatic (CA, n = 20), oligosymptomatic (CO, n = 22) and symptomatic (CS, n = 18). As a negative control, we used fragments of three uninfected dogs from the kennel of UFOP. The parasitological diagnosis used as gold standard was performed by two methods: culture of bone marrow aspirate in culture medium NNN/LIT and direct visualization of amastigotes of the parasite on slides with imprints of skin and spleen. The primers L150/L152 and LINR4/LIN17/LIN19 were used to amplify the conserved region of the *Leishmania* kDNA minicircle in the cPCR and snPCR and qPCR were performed out using the DNA polymerase gene (DNA pol α) primers from *L. infantum*. According to the parasitological test 61.7% the samples were positive. In skin samples, the sensitivity of cPCR was 89.2%, snPCR was 86.5% and qPCR was 97.3%. PPV for cPCR was 36.0%, snPCR was 35.3% and qPCR was 38.1%. The NPV was 93.6%, 92.1% and 98.3% by the techniques of cPCR, snPCR and qPCR. In spleen samples, the sensitivity of cPCR was 81.1%, snPCR was 94.6% and qPCR was 100.0%. PPV for cPCR was 33.9%, snPCR was 37.4% and qPCR was 38.7%. NPV for cPCR was 89.3%, snPCR was 96.7% and qPCR was 100.0%. Positivity in molecular tests increased with the progression of clinical signs. It was observed that the qPCR showed the best results in skin and spleen due to higher sensitivity, PPV and NPV compared to other molecular techniques. Thus, we conclude that the best technique and tissue for molecular diagnosis of CVL is the qPCR skin due to the high sensitivity and easy obtaining the biological sample.

Keywords: *Leishmania*. Molecular diagnostic. PCR. qPCR. snPCR. Skin. Spleen. Canine Visceral Leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas que, segundo a Organização Mundial de Saúde, possuem uma incidência de aproximadamente 1,6 milhões de casos por ano em todo o mundo. As formas clínicas das leishmanioses podem ser agrupadas como: (i) leishmaniose cutânea, que provoca o aparecimento de ulcerações na pele; (ii) leishmaniose cutâneomucosa, caracterizada como uma doença mutiladora que causa deformidades irreversíveis, principalmente na face dos pacientes; (iii) leishmaniose cutâneodifusa, responsável por lesões nodulares não ulcerativas disseminadas em todo o corpo e (iv) leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode evoluir para o óbito quando não tratada (Reithinger et al. 2007; WHO 2010). Com relação a LV, sabe-se que 59.000 pessoas morrem anualmente da doença e sua incidência é cerca de 500.000 casos/ano (Desjeux 2004; WHO 2010). Mais de 90% de todos os casos de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, República do Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar et al. 2012). A LV é uma doença infecto-parasitária, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* e transmitida por dípteros da família Phychodidae, subfamília Phlebotominae, especialmente os do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. (Gebre-Michael et al. 1993; Killick-Kendrick 1999).

No Brasil, até meados da década de 80, a LV ocorria predominantemente em zonas rurais, porém nos últimos anos houve significativa mudança deste perfil epidemiológico a partir de sua expansão e urbanização, comprovada pela ocorrência de inúmeros casos nas grandes cidades (Costa et al. 1990; Dantas-Torres 2006a; Silva et al. 2008; Werneck 2008; Araújo et al. 2012). Dentre as áreas urbanas de maior expansão da LV destaca-se Belo Horizonte, que apresenta uma das maiores prevalências da doença no Brasil, além da elevada letalidade (Harhay et al. 2011; Araújo et al. 2012). Um dos principais motivos da urbanização da LV é a boa adaptação do vetor ao ambiente domiciliar e a presença do reservatório. O cão doméstico (*Canis familiares*) é considerado o principal reservatório do parasito no ciclo urbano por apresentar um intenso parasitismo cutâneo comportando-se como fonte de infecção para o vetor (Molina et al. 1994; Giunchetti et al. 2006). Neste contexto, o cão tem um papel essencial para disseminação e amplificação dos focos endêmicos, antecedendo, na maioria das vezes, o aparecimento de casos humanos (Falqueto et al. 1986; Nunes et al. 2010).

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) instituído no Brasil tem as seguintes diretrizes: a) o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; b) o controle vetorial; c) a eliminação dos reservatórios pela eutanásia de cães sororeativos e, d) atividades de educação em saúde (Brasil 2006). O programa apresenta algumas limitações no quesito eliminação do reservatório doméstico, devido a demora entre o diagnóstico e eutanásia dos animais infectados, bem como à baixa sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos empregados (Braga et al. 1998; Vieira 1998; Grimaldi et al. 2012b; Quinzel et al. 2013), além da reposição imediata de cães pela população (Ashford et al. 1998; Andrade et al. 2007; Nunes et al. 2010). Estas limitações podem estar contribuindo para o aumento na expansão da LV no ambiente urbano.

Diferentes metodologias são utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) e podem ser divididas em: (i) isolamento do parasito, (ii) métodos moleculares e (iii) técnicas de imunodiagnóstico (Gontijo & Melo et al. 2004). Apesar da grande variedade de testes disponíveis, a RIFI e o ELISA foram até pouco tempo as técnicas utilizadas nos inquéritos caninos realizados pelo PVC-LV, entretanto a aplicabilidade destes testes é bastante questionada devido à baixa sensibilidade e especificidade (Braga et al. 1998; Moreira et al. 2004; Silva et al. 2012). Recentemente o Ministério da Saúde substituiu os testes antes preconizados, pelo teste imunocromatográfico (DPP[®]) para triagem e o ELISA em soro, como confirmatório, porém a aplicação dos mesmos para o diagnóstico e controle da LVC são questionados (Grimaldi et al. 2012a; Quinzel et al. 2013). Neste sentido, é de grande importância e necessidade o aprimoramento de técnicas moleculares que apresentem uma maior acurácia no diagnóstico da LVC.

Em todo mundo, os métodos moleculares estão entre as técnicas de diagnóstico mais utilizadas no contexto da pesquisa científica (Queiroz et al. 2011; Hamarsheh et al. 2012; Lombardo et al. 2012; Morales-Yuste et al. 2012). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem melhorado significativamente a sensibilidade na detecção precoce da infecção canina por *L. infantum* (Solano-Gallego et al. 2001; Coura-Vital et al. 2011). Além da PCR convencional, os laboratórios vêm testando outras variações desta técnica para o diagnóstico da LVC, dentre elas, a *seminested* PCR e a PCR em Tempo Real (Aransay et al. 2000; Gomes et al. 2008; Miró et al. 2008; Maia et al. 2009). Diversos estudos mostraram que a sensibilidade e especificidade destas técnicas

apresentam variações significativas (Reithinger et al. 2000; Solano-Gallego et al. 2011; Silva et al. 2012) ocasionadas principalmente pelo iniciador direcionado a diferentes alvos moleculares, número de ciclos empregados na reação, métodos de extração do DNA e origem do material biológico (Lachaud et al. 2002; Cortes et al. 2004; Baneth 2008; Maia et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2009). Neste sentido, é fundamental o desenvolvimento de estudos que busquem melhor e padronizar os protocolos para o diagnóstico molecular da LVC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cão no contexto da Leishmaniose Visceral

A importância do cão no contexto de LV tem sido estudada desde 1908, quando Nicolle & Comte, na Tunísia, observaram a presença do parasito na pele destes animais, sugerindo que os mesmos participariam da cadeia de transmissão do parasito como reservatórios (Alves 2006). Esta hipótese foi confirmada posteriormente por Laveran (1914) no Instituto Pasteur, que reproduziu a infecção experimental por *L. infantum* em 25 cães, encontrando e descrevendo o parasito na pele e outros órgãos destes animais.

No Brasil, um dos primeiros estudos epidemiológicos foi realizado em 1938 por Chagas, Ferreira, Deane & Guimarães, na região de Abaeté, localizada no estado do Pará, onde relataram uma incidência de 1,48% de infecção humana e 4,49% de infecção canina. Posteriormente, em 1955 Deane & Deane conduziram um amplo estudo no estado do Ceará, região com alta prevalência de LV, contribuindo para o entendimento da epidemiologia da *L. infantum* e reforçando a importância do cão como reservatório doméstico e da raposa (*Dusicyon vetulus*) como reservatório silvestre do parasito (Deane 1956; Deane & Deane 1962a). Outros membros da família Canidae também são apontados como reservatórios: *Licalopex vetulus* (Deane 1956) e *Cerdocyon thous* (Lainson & Shaw 1987; Curi et al. 2006). Sendo que, de forma geral, o cão desempenha o papel mais importante como fonte de transmissão de *L. infantum* para o vetor e conseqüentemente para o homem, principalmente em áreas rurais e urbanas, ficando aos demais canídeos a manutenção do ciclo silvestre do parasito (Alvar et al. 2004). Os cães também podem ser infectados por outras espécies de *Leishmania*, responsáveis pela forma cutânea e cutâneomucosa da doença (Lemrani et al. 2002; Dantas-Torres, 2006b), entretanto, para essas espécies eles não apresentam importância epidemiológica (Dantas-Torres, 2006b). Recentemente tem sido demonstrada a participação de outros hospedeiros da *L. infantum*, como o gato doméstico (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*) e roedores (*Rattus rattus*; *Nectomys squamipes*; *Proechimys canicollis*) (Savani et al. 2004; Oliveira et al. 2005; Dantas-Torres, 2006a). A importância destes animais e de outros mamíferos no contexto epidemiológico da LV necessita ainda de maiores investigações. O cão é considerado o mais importante reservatório urbano da LV por apresentar alta prevalência da doença (Coura-Vital et al. 2011) e pela elevada carga parasitária na pele, tornando-o uma considerável fonte de infecção para o vetor (Molina et al. 1994). Por esta razão esses animais são

considerados alvos para os programas de controle da doença (Moreno et al. 2002; Alvar et al. 2004; Baneth et al. 2008).

A LVC produz um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, como consequência do parasitismo das células do sistema mononuclear fagocitário pela *Leishmania*. A presença do parasito nos órgãos e tecidos, associada à resposta imune do cão, determinam reações inflamatórias que produzem as lesões e sinais clínicos característicos da doença (Alvar et al. 2004; Reis et al. 2006a). Neste contexto, a doença no cão pode permanecer assintomática por um longo período, evoluindo para a autocura (Grimaldi et al. 2012) ou evoluir para a forma grave, podendo levar o animal a óbito (Mancianti et al. 1988; Garg 2006). As formas clínicas características da LVC são: (i) assintomática, caracterizada pela ausência de sinais clínicos, (ii) oligossintomática, na qual os animais apresentam até três sinais clínicos não debilitantes da doença e (iii) e sintomática, onde os cães apresentam mais de três sinais clínicos sugestivos da doença (Mancianti et al. 1988; Reis et al. 2006; Reis et al. 2009). Os sinais clínicos iniciais da LVC são: hipertrofia do linfonodo, dermatite periorbital e nasal, pelagem opaca, onicogribose e edema das patas. Outros sinais, como febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, perda de peso, hepatoesplenomegalia, ulceração cutânea (nariz, orelhas e cauda) e conjuntivite são frequentes, embora não necessariamente presentes em todos os animais (Almeida et al. 2005; Baneth et al. 2008; Reis et al. 2009). Quanto aos parâmetros bioquímicos, observam-se alterações nos níveis protéicos entre cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Observa-se também um aumento na concentração de globulina, além da redução de albumina e da razão A/G de acordo com a progressão clínica (Almeida et al. 2005; Reis et al. 2006b).

2.2 Medidas de controle da LVC

As medidas para o controle da LV estabelecidas por Deane (1956) baseiam-se em um tripé de ações que preconizam o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida no domicílio e peridomicílio e a eutanásia de cães soropositivos. Apesar do conhecimento e da utilização destas medidas desde a década de 50, as estratégias de controle têm se mostrado pouco efetivas (Werneck et al. 2002). O Ministério da Saúde brasileiro, através do PVC-LV tem instituído medidas específicas para controlar a disseminação da doença pelo país. É preconizado o diagnóstico precoce e tratamento

dos casos humanos, a identificação e eutanásia de cães sororeativos, o controle vetorial e a educação em saúde (Brasil 2006). Além disso, o PVC-LV busca uma melhor definição das áreas de transmissão e/ou de risco e propõe ações de vigilância para os municípios considerados silenciosos (Brasil 2006). A realização dessas medidas isoladamente, não tem apresentado efetividade para redução da incidência da doença (Lemos et al. 2008). Estes fatos apontam para a necessidade de reavaliação da política de controle da LV no Brasil (Costa 2001).

Atualmente, o Brasil é o único país que adota um programa de eliminação de cães soropositivos como parte das medidas de controle para a LV (Costa et al. 2011). Esta medida vem apresentando uma série de dificuldades em sua execução, uma vez que não tem reduzido significativamente a incidência da doença e por ser muitas vezes inaceitável pelo proprietário do cão. Um dos possíveis motivos da falha desta medida de controle é a demora entre a coleta da amostra biológica, sua análise e a eutanásia dos animais infectados (Braga et al. 1998; Vieira 1998; Moreira et al. 2004; Grimaldi et al. 2012). Além disso, após a eutanásia do cão soropositivo, geralmente o proprietário adquire outro quase imediatamente, o que interfere no controle, devido à susceptibilidade destes animais que se tornam infectados rapidamente, dificultando ainda mais o controle dos reservatórios (Dye 1996; Moreira et al. 2004). Esses fatores contribuem para a controvérsia e falta de consenso quanto à efetividade da eutanásia dos cães positivos como uma medida de controle e redução da incidência da LV humana e canina (Ashford et al. 1998; Nunes et al. 2010). Um estudo realizado no estado do Espírito Santo constatou que após a eliminação de cães soropositivos, a positividade humana aumentou na mesma proporção que na área onde não houve remoção dos cães (Dietze et al. 1997). Entretanto, outros estudos mostraram que as remoções e eutanásias, sendo rapidamente realizadas, reduzem consideravelmente a incidência de LVC e LVH, principalmente quando realizadas simultaneamente às medidas de controle vetoriais e ao tratamento dos casos humanos (Ashford et al. 1998; Braga et al. 1998). Neste contexto, Grimaldi (2012) avaliaram, durante um estudo prospectivo em uma área endêmica no estado do Espírito Santo, o efeito da remoção rápida de cães infectados na prevalência e incidência de infecção canina usando um teste rápido imunocromatográfico. Os resultados foram avaliados medindo taxas de soropositividade e soroconversão dos cães, e os mesmos demonstraram que a detecção e eliminação concomitante dos cães soropositivos podem diminuir as taxas de infecções caninas e a incidência da doença

temporariamente, embora seja insuficiente para interromper a transmissão zoonótica da leishmaniose.

Com relação ao controle vetorial, o Brasil foi o primeiro país a utilizar o inseticida DDT contra flebotomíneos. O extinto "Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu)" iniciou a utilização deste inseticida, na década de 50, contra vetores em locais com focos de leishmaniose. Atualmente o PVC-LV utiliza inseticida da classe dos piretróides, como a deltametrina, cipermetrina, alfacipermetrina, dentre outros (Brasil 2006). Uma medida preventiva que têm apresentado bons resultados na redução da incidência de LVC é o uso de coleiras impregnadas com deltametrina ou formulações tópicas a base de permetrina (Killick-Kendrick et al. 1997; Foglia Manzillo et al. 2006; Courtenay et al. 2009). Um estudo realizado em uma região endêmica da Itália demonstrou que o uso dessas coleiras reduziu em 84% o risco de infecção canina por *L. infantum* (Ferroglia et al. 2008). Esta é uma boa estratégia a ser utilizada em áreas de alta transmissão, entretanto seu custo ainda é elevado, dificultando sua aquisição pela população de baixa renda, a principal acometida pela doença. Além disto, nos países europeus que margeiam o mediterrâneo ocorrem dois picos de transmissão anuais enquanto no Brasil e em outros países tropicais a transmissão ocorre de modo contínuo, o que necessitaria de estudos que avaliassem o potencial uso de coleiras em programas de controle de modo a medir seu tempo de uso, troca e validade de ação inseticida.

Na Região Sudeste, Minas Gerais é o estado de maior incidência da doença, principalmente as regiões norte e nordeste do estado, onde várias cidades são endêmicas para LV, dentre elas os municípios de Montes Claros e Porteirinha. Nestas cidades há uma elevada prevalência de LVC e alta densidade do vetor *Lu. longipalpis* (França-Silva et al. 2003; França-Silva et al. 2005; Monteiro et al. 2005). Em Belo Horizonte, desde 1993 são realizados inquéritos sorológicos para a detecção de cães sororeativos, como parte das ações do programa de controle desenvolvido pela Secretaria Municipal de Saúde através do Departamento de Controle de Zoonoses.

Recentemente o Ministério da Saúde, através da Nota Técnica Conjunta 001/2011 recomendou a substituição do ELISA em eluato de papel filtro como teste de triagem e a RIFI como confirmatório, pelo teste imunocromatográfico (DDP[®]) para triagem e o ELISA em soro, como confirmatório. Apesar destas alterações, os testes

sorológicos ainda são questionados devido à baixa sensibilidade na detecção de cães com baixos títulos sorológicos (Grimaldi et al. 2012; Quinzel et al. 2013).

Neste contexto, para um melhor controle da LV é necessário o emprego de testes diagnóstico com maior acurácia e capazes de identificar um maior número de animais que sejam fonte de infecção para o vetor, particularmente aqueles que se encontram entre o período de infecção e o início da infectividade, reduzindo efetivamente a transmissão da doença pelos flebotomíneos (Courtenay et al. 2002). Até o momento ainda não dispomos de tais métodos e desta forma o PVC-LV ainda vem sendo mantido com um diagnóstico canino moroso, com baixa sensibilidade e especificidade, o que possivelmente repercute no insucesso frequente do programa.

2.3 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico clínico da LVC é extremamente difícil, pois os sinais clínicos quando presentes podem ser confundidas com outras doenças dificultando o diagnóstico diferencial, sendo observado poucas alterações patognomônicas na LVC (onicogrifose, ceratoconjuntivite e dermatite furfurácea). Além disso, mais de 50% dos animais parasitados podem permanecer assintomáticos durante um longo período (Gradoni et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2009). Até a década de 30, o diagnóstico canino era realizado por meio dos exames diretos, através da punção de fígado, baço e raspado de pele. Esses métodos apresentavam limitações, pois apesar da grande especificidade, possuíam baixa sensibilidade (Gontijo & Melo et al. 2004). Um método convencional de diagnóstico parasitológico é a visualização do parasito em esfregaços por aposição empregando-se microscopia óptica, que apresenta sensibilidade dependente da carga parasitária e especificidade de quase 100% (Carvalho et al. 2009). A existência de um intenso parasitismo permite facilmente a visualização de amastigotas elevando assim, a sensibilidade deste método, entretanto, quando o parasitismo é baixo, a sensibilidade reduz consideravelmente (Reis et al. 2006). Outro método parasitológico clássico é o isolamento do parasito em meio de cultura NNN-LIT, que são úteis para identificar o parasito, porém, este demanda longo tempo (em torno de um mês) para a obtenção do resultado (Solano-Gallego et al. 2011). Apesar dos avanços tecnológicos, ainda não existe uma técnica padrão ouro ou um método absolutamente preciso para o diagnóstico da LVC. Na maioria dos casos, o diagnóstico final é obtido utilizando uma combinação de testes distintos.

Historicamente, a RIFI começou a ser utilizada a partir da década de 60 em substituição à reação de fixação do complemento. Esta reação apresentava sensibilidade variando de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80%, devido a reações cruzadas com outras doenças (Barbosa-de-Deus et al. 2002; Porrozzi et al. 2007). A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, vários trabalhos avaliando o teste de ELISA, assim como suas diversas variações metodológicas (Hommel et al. 1978; Pappas et al. 1983; Cabrera et al. 1999). A utilização de antígenos recombinantes (rA2, rK9, rK26 e rK39) e purificados de glicoproteínas de membranas (gp63, gp72 e gp70), otimizaram a sensibilidade e a especificidade da técnica de ELISA (Boarino et al. 2005; Porrozzi et al. 2007). O *Direct Agglutination Test* (DAT), citado como um método alternativo para o diagnóstico da LV foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção canina no final da década de 80 (Safi et al. 1989). Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último demonstrou semelhante sensibilidade e especificidade quando comparado aos outros testes (Evans et al. 1990; Silva et al. 2006). Posteriormente, surgiram diferentes testes: FAST (*Fast Agglutination Screening Test*), Western Blotting, IDA (*Immunodiffusion assay*), dentre outros, como alternativas para o diagnóstico da LVC, entretanto, apresentam limitações em relação aos testes sorológicos convencionais, RIFI e ELISA (Maia et al. 2008; Miró et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009). Babakhan et al. (2009) compararam o FAST e o DAT em soro de cães infectados com *L. infantum* em uma região endêmica no Iran e demonstraram que houve um bom grau de concordância entre os testes (86,8%). Eles concluíram que o FAST pode ser uma ferramenta de diagnóstico pratica e simples para ser utilizada no diagnóstico da LVC em áreas endêmicas do Iran.

Os testes imunocromatográficos, em especial os testes rápidos, representam o mais recente avanço no contexto do diagnóstico da LVC (Maia et al. 2008). A rapidez do resultado e a facilidade de realização, que dispensa laboratórios ou técnicos especializados, fazem com este tipo de teste possa ser aplicado como triagem imediata de animais suspeitos de LVC em clínicas veterinárias além da sua utilização em inquéritos epidemiológicos no campo (Marcondes et al. 2011). Embora de manuseio fácil, alguns autores afirmam que os testes rápidos, existentes no mercado, apresentam baixa especificidade e/ou baixa sensibilidade quando comparados com as técnicas sorológicas convencionais, o que limitaria seu uso como diagnóstico confirmatório

(Maia et al. 2008; Lima et al. 2010). Um desses testes imunocromatográficos é o DPP[®] surgiu recentemente como uma alternativa para o diagnóstico da LVC (Grimaldi et al. 2012). Silva (2012) compararam os testes diagnósticos ELISA, RIFI e DPP[®] utilizando diferentes antígenos em amostras de soro de cães de uma área endêmica de LVC. Ao analisar a sensibilidade e especificidade dos testes, concluíram que o teste de ELISA com antígenos de *L. infantum* foi o melhor para o diagnóstico de LVC, mas o ensaio imunocromatográfico também apresentou bons resultados. Coura-Vital (2011) ao estudarem a prevalência da infecção por *L. infantum* em cães de uma região endêmica através de métodos moleculares (PCR-RFLP), demonstrou que os métodos sorológicos disponíveis subestimam a prevalência de cães infectados. Sendo assim, a utilização do diagnóstico molecular possibilitaria a detecção da infecção por *Leishmania* precocemente, antes da ativação da síntese de anticorpos e consequentemente da soroconversão.

Até 2011 o Ministério da Saúde recomendava como métodos de diagnósticos para controle da LVC o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) – (titulação $\geq 1: 40$) como método confirmatório (Brasil 2006). Os resultados destes testes eram usados como critério para a eutanásia dos cães sororeativos pelo PVC-LV. Com o intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde encomendou um estudo à Fiocruz/RJ com o intuito de validar os testes sorológicos atualmente adotados na Rede Pública e do teste rápido imunocromatográfico (DPP[®]). A partir dos resultados desse estudo foi recomendado, por meio da Nota Técnica Conjunta N°01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, publicada em 29 de dezembro de 2011, a utilização do teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório. A realização do DPP[®] poderá ser realizada a partir de amostras de sangue total, soro ou plasma. Enquanto para a realização do ELISA está indicado apenas o soro sanguíneo obtido de coleta de punção venosa, não sendo recomendado mais o uso do papel filtro. Este protocolo recomendado está sendo implementado pelo PVC-LV gradativamente em todos os estados brasileiros.

Considerando as limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, verifica-se a necessidade de aprimoramento das técnicas que sejam capazes de promover um diagnóstico mais acurado da LVC. Dessa forma, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos e aprimorados para o diagnóstico da LVC em

diversas amostras clínicas (Maia et al. 2010; Almeida et al. 2012). São várias as técnicas inovadoras que se encontram em desenvolvimento e aprimoramento, podendo-se destacar entre elas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, *nested*-PCR, RT-PCR, PCR em Tempo Real) (Gomes et al. 2008; Maia et al. 2009).

Uma das variantes da PCR, a *seminested* PCR (snPCR), foi proposta por Aransay (2000) para identificar diferentes espécies de *Leishmania* em flebotomíneos. A diferença proposta nesta técnica foi a utilização de duas amplificações com três iniciadores, sendo que o terceiro iniciador é interno somente a uma extremidade da sequência-alvo. Esta modificação tem como propósito melhorar a especificidade e a eficiência da reação, baseado no fato de que o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora da sequência-alvo. Posteriormente utilizando-se este primeiro produto, segue-se a amplificação da real sequência-alvo. Quando essas etapas ocorrem concomitantemente, a reação é denominada *nested* PCR. Porém quando ocorre em duas reações separadas, é chamada de *seminested* PCR. Por meio de um estudo transversal realizado em uma área endêmica na Itália, Di Muccio (2012) avaliou o desempenho da *nested* PCR em amostras de creme leucocitário e mucosa conjuntival de cães, em comparação com a RIFI e microscopia de linfonodo. Seus resultados demonstraram que a *nested* PCR foi o método mais sensível em relação às outras técnicas, com o maior desempenho relativo (76,4%). Em outro estudo recente, Silva (2012) encontraram 76,9% e 69,2% de positividade pelas técnicas de PCR convencional e *seminested* PCR, respectivamente, ao comparar raspados de lesão de pacientes com leishmaniose cutânea. Esses resultados ressaltam que a técnica molecular em ambos os ensaios possuem bom potencial para diagnóstico laboratorial das leishmanioses.

Iniciadores desenvolvidos para amplificar sequências alvo multicópias, como a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto, tem aprimorado o diagnóstico de infecções por *Leishmania* (Reale et al. 1999). Entretanto é importante salientar que as informações fornecidas pela PCR devem ser analisadas em conjunto com os aspectos clínicos e avaliações sorológicas dos cães e os animais soronegativo/PCR+ não devem ser eutanasiados e sim monitorados (Solano-Gallego et al. 2011, Coura-Vital et al. 2011). A PCR torna-se uma técnica de grande praticidade, devido à possibilidade de ser realizada em diversos tipos de material biológico, como:

tecidos, sangue, fluidos corporais ou até mesmo cortes histológicos emblocados em parafina (Solano-Gallego et al. 2011). Outra vantagem é a possibilidade de detecção do DNA mesmo quando este se apresenta em quantidades mínimas nas amostras biológicas. A detecção do DNA de *Leishmania* em tecidos pela PCR permite uma maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da infecção quando comparada a outras técnicas utilizando o mesmo material biológico (Maia et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2009).

Recentemente foi desenvolvida a reação de amplificação de DNA quantitativa em tempo real (qPCR), que é baseada no uso de fluorocromos ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Em uma PCR em tempo real, a análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal traça um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (Kubista et al. 2006). O ciclo em que o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado *Ct* e, o momento em que o *Ct* é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (Mortarino et al. 2004). Sendo assim, denomina-se *Ciclo Threshold* ou *Ct* o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*). Um dos tipos de sistema de detecção utilizado na PCR em tempo real é o SYBR Green[®]. Esse sistema está relacionado a uma cianina assimétrica que se liga inespecificamente as fitas duplas de DNA ou cDNA formadas durante a amplificação. Nesse sistema, quando o fluorocromo está livre em solução não emite fluorescência, porém, quando se liga a moléculas de DNA emite um sinal luminoso forte (Nygren et al. 1998; Wortmann et al. 2001). Esta técnica vem sendo amplamente utilizada em estudos relacionados à carga parasitária, à interação entre parasito e hospedeiro e monitoramento de esquemas terapêuticos a partir de amostras clínicas provenientes de pacientes e de cães com leishmaniose (Quaresma et al. 2009; Khademvatan et al. 2011; Weirather et al. 2011). Pelo fato de não apresentar os vários passos de manipulação pós-amplificação utilizados na técnica de PCR convencional, a qPCR minimiza os riscos de contaminação do material, além de permitir de forma simultânea a detecção e quantificação da carga parasitária (Vitale et al. 2004). Além disso, um estudo feito em amostras de sangue total e aspirado de linfonodo de cães naturalmente infectados por meio de qPCR, indicou que existe uma relação positiva

entre a carga parasitária e as manifestações clínicas da LVC (Manna et al. 2009). Apesar de todas essas vantagens, ainda não existe um consenso de que a qPCR é a técnica mais sensível, pois existem variações como o tecido utilizado e a eficiência dos iniciadores. Em um estudo recente, Solcà (2011) compararam a sensibilidade da PCR convencional e da qPCR em amostras de baço de cães naturalmente infectados. Foi observado que a sensibilidade da PCR convencional foi de 88,9%, mostrando-se superior a sensibilidade da qPCR (83,3%).

As técnicas moleculares apresentam uma série de variáveis que afetam seu desempenho, tais como: quantidade de DNA a ser amplificado, método empregado na extração do DNA, protocolo de amplificação e a forma de detecção do material amplificado (Reithinger et al. 2000; Baneth et al. 2008). Parte desta variação pode ser explicada pela distribuição heterogênea do parasito pelos tecidos e órgãos e pela resposta imune local (Maia et al. 2009). Solano-Gallego (2011) consideram que as amostras clínicas mais sensíveis para o uso de técnicas moleculares no diagnóstico da LVC são: medula óssea, linfonodo, baço e pele. Entretanto essa sensibilidade pode variar de acordo com a técnica molecular utilizada. Estes achados indicam que a utilização de diferentes tecidos pode levar a uma variação nos resultados da técnica, o que corrobora a necessidade de uma melhor comparação e avaliação deste tipo de teste diagnóstico.

3 JUSTIFICATIVA

3.1 Justificativa e relevância

A leishmaniose visceral é uma zoonose considerada, dentre as doenças negligenciáveis, a que se encontra em maior expansão, com grande impacto e prejuízo à saúde pública. Nos últimos anos a doença expandiu para diversas áreas urbanas do país, e neste contexto, o cão tem um papel importante na disseminação e ampliação dos focos endêmicos, antecedendo, na maioria das vezes, o aparecimento de casos humanos.

Apesar dos testes sorológicos (DPP[®] e ELISA) serem os métodos de diagnóstico preconizados pelo Ministério da Saúde na rotina de inquéritos epidemiológicos para LVC, os métodos moleculares tem surgido como uma boa alternativa para o diagnóstico precoce da infecção canina e em casos de sorologia inconclusiva. Estes métodos têm demonstrado que os testes sorológicos subestimam as reais taxas de infecção canina encontradas nas áreas endêmicas. Além disso, os testes moleculares como a qPCR são recomendadas no monitoramento da cura parasitológica em diferentes tecidos e nas avaliações de eficácia terapêutica. Apesar destes benefícios, ainda não há um consenso na literatura de qual a melhor técnica molecular e o melhor tecido a ser utilizado.

Diante disso, apresentam relevância estudos que busquem comparar e avaliar a detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (seminested PCR e qPCR) em diferentes tecidos, para o diagnóstico da LVC.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Comparar as técnicas moleculares (PCR convencional, *seminested* PCR e PCR em tempo real) no diagnóstico da LVC empregando diferentes tecidos.

4.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a positividade para LVC por meio de testes parasitológicos em cães portadores de diferentes formas clínicas;
- Realizar os testes de diagnóstico molecular (PCR convencional, *seminested* PCR e PCR em tempo real) em cães portadores de diferentes formas clínicas;
- Avaliar o desempenho dos testes moleculares em cada tecido em relação ao teste parasitológico padrão ouro.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

O presente trabalho foi realizado com amostras biológicas de 60 cães (*Canis familiaris*), destes 28 eram fêmeas e 32 eram machos, idades variadas e sem raça definida (SRD) provenientes do município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Todas as amostras foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em animais naturalmente infectados por *L. infantum*, com diagnóstico positivo em dois testes sorológicos (RIFI e ELISA, Biomanguinhos, Fiocruz/RJ, Brasil) para *Leishmania spp*, realizados pelo Laboratório de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (LZOON).

O projeto foi aprovado nos Comitês de Ética das seguintes Instituições: Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer 020/2007), Universidade Federal de Ouro Preto (Parecer 2007/83) e Comitê de Ética da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (Parecer 001/2008).

5.2 Caracterização clínica dos animais

A avaliação clínica dos cães foi realizada pelo médico veterinário Dr. Rodolfo Giunchetti, se baseou na presença ou na ausência de sinais sugestivos da infecção por *Leishmania spp*, tais como: onicogribose, atrofia muscular, lesões de pele, dermatite furfurácea, alopecia, ceratoconjuntivite, parestesia dos membros posteriores, emagrecimento, dentre outras. Em seguida os animais foram agrupados de acordo com a forma clínica apresentada, seguindo os critérios estabelecidos por Mancianti (1988) e revisto por Reis (2006). Assim, os grupos foram constituídos por animais assintomáticos (CA), os que não apresentavam sinal clínico; oligossintomáticos (CO), os que apresentavam de um a três sinais clínicos e sintomáticos (CS), os que apresentavam mais de três sinais clínicos (Figura 1).



Figura 1: Fotografia representativa de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, considerando a forma clínica, utilizados no estudo. (A) Cão assintomático, (B) cão oligossintomático e (C) cão sintomático.

5.3 Obtenção das amostras biológicas

Para a realização do teste parasitológico que será utilizado como padrão ouro, a punção de medula óssea foi realizada na região da crista da tíbia utilizando agulha 18G acoplada em uma seringa de 20,0 mL. Antes deste procedimento, os animais foram anestesiados com Tiopentax[®] (30mg/Kg, Cristália). Em seguida, com o animal ainda anestesiado foi realizada a eutanásia com solução saturada de KCl aplicada por via endovenosa. A necropsia dos cães foi realizada subsequentemente e fragmentos de pele e baço foram coletados. O material biológico coletado (pele e baço) foi devidamente identificado, armazenado e congelado a -80°C para a posterior realização das técnicas moleculares.

5.4 Diagnóstico parasitológico (padrão ouro)

5.4.1 Isolamento do parasito

Um volume máximo de 1,0 mL de medula óssea foi aspirado cuidadosamente na região da crista da tíbia dos animais ainda anestesiados e transferidas em condições de esterilidade para três tubos de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT. Os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada B.O.D (FANEM[®] modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e após 7 dias, foram feitas duas lâminas de cada tubo para avaliação em microscópio óptico afim de visualizar o parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubos e repassado para um novo tubo

contendo 3 mL NNN/LIT e após 7 dias feita uma nova avaliação em microscópio. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes sendo que ao final de três “repiques”, não sendo identificados parasitos, os tubos eram descartados. Os tubos que foram identificados contaminados, presença de bactérias ou hifas de fungos, foram imediatamente descartados. Parte do material coletado foi transferido para tubos de criopreservação de 2 mL para a criação de um criobanco.

5.4.2 Exame direto em esfregaços

Os esfregaços por aposição (*imprints*) foram confeccionados logo após a coleta de pequeno fragmento de pele e de baço. Utilizando pinça estéril, esses fragmentos de tecidos foram pressionados em lâminas previamente limpas e desengorduradas, fixados com solução de álcool metílico e coradas empregando o kit Panótico Rápido LB - Laborclin[®]. Estes *imprints* foram analisados por microscopia óptica (aumento de 1000x), avaliando a presença ou ausência de formas amastigotas de *Leishmania* no esfregaço.

5.5 Diagnóstico Molecular

5.5.1 Extração de DNA

Os tecidos (baço e pele) previamente armazenados a -80°C foram cortados, com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 30mg. Essas amostras foram transferidas para tubos tipo *ependorf* previamente identificados e em seguida foi realizado o procedimento de extração do DNA utilizando o kit Wizard[™] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), seguido as recomendações do fabricante com algumas alterações: foram adicionadas aos tubos 500 µL de solução de lise nuclear e essa mistura foi mantida em gelo por 2 minutos. Após homogeneização, em cada tubo foi adicionado 20 µL e 30 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich[®], USA) para as amostras de pele e de baço, respectivamente, na concentração de 20 mg/mL, e estes foram mantidos *overnight* em banho seco a 55°C. Após este período, foi adicionado 3 µL de RNase e as amostras foram incubadas por 30 minutos em banho seco a 37°C. Após incubação, os tubos foram mantidos em

temperatura ambiente por 5 minutos e foi adicionado 200 μ L de solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (Vision Scientific[®], Korea), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g (Microcentrífuga Eppendorf[®]- Modelo 5418, NY, USA). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600 μ L de isopropanol (Merck[®], Darmstad, Alemanha). O tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200 μ L de solução de etanol 70% (Merck[®], Darmstad, Alemanha). Posteriormente foi realizada nova centrifugação a 16.000 g, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados 100 μ L de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24h a temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus[®], GE Healthcare, USA). Após a dosagem as amostras foram armazenadas a 4°C até o momento da análise pelos três métodos moleculares.

5.5.2 Iniciadores utilizados nas técnicas moleculares

As informações referentes aos iniciadores utilizados neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos (iniciadores) empregados nas técnicas moleculares.

Método molecular	Iniciadores	Alvo	Sequência do nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)
PCR ^a	L150/L152	kDNA	Forward: GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA Reverse: (G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C	120
snPCR ^b	LINR4	kDNA	Forward: GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG	700
	LIN17	kDNA	Reverse: TTT GAA CGG GAT TTC TG	
	LIN19	kDNA	Reverse: CAG AAC GCC CCT ACC CG	
qPCR ^c	DNA Pol α	DNA Pol α	Forward: TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG Reverse: GCA TCG CAG GTG TGA GCA C	90
	G3PDH	G3PDH	Forward: TCA ACG GAT TTG GCC GTA TTG G Reverse: TGA AGG GGT CAT TGA TGG CG	90

^aPCR convencional

^b*Seminested* PCR

^cPCR em Tempo Real

5.5.3 PCR convencional (PCRc)

Foi empregado o par de iniciadores L150 [5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3'] e L152 [5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3'], direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Degraeve et al. 1994), na região de 120 pares de base. A reação constituiu de: tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 μM de dNTP, 1,0 pmol de cada iniciador (L150 e L152), 0,76 U Taq DNA polimerase (Fermentas - Sinapse[®]), 1 μL de DNA e H₂O Milli Q totalizando 12,5 μL por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Thermal Cycler 96well (Applied Biosystems[®], Califórnia, USA).

5.5.3.1 Análise dos produtos da PCR convencional

Após amplificação 5 μL do produto obtido foram ressuspensos em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25% e 15% de ficol) e aplicados em gel de poliacrilamida 10%. A corrida eletroforética foi realizada a 90V e 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM e EDTA a 2mM) em um sistema de cubas preparadas para 80 amostras. Foi utilizado como marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos et al. 1993).

5.5.4 PCR em Tempo Real (qPCR)

5.5.4.1 Clonagem

Para a construção da curva padrão utilizada na qPCR, foi realizada uma clonagem do gene da DNA polimerase de *Leishmania*. Para isto, o gene de interesse foi

amplificado por PCR convencional a partir de DNA total extraído pelo kit WIZARD[®] DNA isolation kit (Promega, EUA), conforme descrito anteriormente.

Para a reação de PCR, foi utilizado DNA de *L. infantum* (1,0 ng/μL). A reação constituiu das mesmas condições utilizadas para as amostras de tecidos (baço e pele). Parte do produto final da reação foi aplicada em um gel de agarose 1,5% (Invitrogen Life Technologies, EUA), para comprovar o resultado da amplificação pela visualização da banda de interesse (90 pb). Após confirmação da presença e integridade da banda de interesse, e a ausência de outros amplicons, o produto da PCR foi clonado utilizando o sistema de clonagem pGEM T (Promega, EUA) conforme manual do fabricante. Para cada reação de ligação, foi preparado um *mix* contendo 5 μL de “2X Rapid Ligation Buffer”, 1 μL de “p-GEM-T Easy Vector” e 1 μL de “T4 DNA Ligase” e a razão molar foi 8:1 de inserto e vetor. Após ser homogeneizado, o tubo foi mantido *overnight* a 4°C para ocorrer à reação de ligação do inserto no vetor. Os plasmídios contendo insertos foram então utilizados para transformar bactérias DH5α competentes.

5.5.4.2 Preparo de bactérias competentes

As bactérias DH-5α foram inoculadas em 5 mL de meio Luria Bertani (LB)1X (Bacto triptona 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v; NaCl 171 mM) que foi mantido sob agitação a 180 rpm (*Shaker*, Innova 44) e 37°C por 16 horas. A cultura bacteriana foi transferida para 500 mL de meio LB e novamente incubada a 37°C sob agitação. O crescimento foi acompanhado até a cultura atingir uma absorbância (A_{600 nm}) igual a 0,6 nm, correspondendo ao crescimento equivalente à metade da fase logarítmica. As bactérias foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C e o sedimento homogeneizado em 150 mL de solução (75 mM de CaCl₂, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0). Subsequentemente, a suspensão bacteriana foi incubada em gelo por 20 minutos e centrifugada, como descrito previamente. O sedimento celular foi ressuspensão em 30 mL da mesma solução, acrescida de 15% de glicerol e congelado rapidamente em uma mistura de gelo seco e álcool, que foi mantida a -80°C, até o momento do uso.

5.5.4.3 Transformação bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada utilizando 5 μL da reação de ligação (com T4 DNA ligase para ligar o inserto no vetor), adicionadas a 50 μL de bactéria

Escherichia coli DH5- α quimiocompetentes. Esta mistura foi homogeneizada levemente e mantida em gelo por 30 minutos, subsequentemente foi transferida para um banho aquecido a 42°C e mantidas nele por 2 minutos. Em seguida, a mistura foi colocada em banho de gelo por 2 minutos, sendo imediatamente adicionado a 1 μ L de meio LB 1X sem antibióticos em cada tubo, os quais foram incubados por 1 hora no *Shaker* a 200-300 rpm a 37°C. A cultura bacteriana centrifugada, a 1.000 rpm por 5 minutos e em seguida, homogeneizada em 100 μ L de meio LB. Posteriormente um volume de 50 μ L foi semeado em placas de Petri contendo LB-ágar (LB acrescido de 1% de ágar) acrescido de ampicilina (100 mg/mL), 0,4 μ L de *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) e 4 μ L de *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside* (X-Gal) 4%. Após este procedimento a placa foi incubada em estufa B.O.D. (Estufa D.B.O., EletroLab, Brasil) a 37°C *overnight*. Após 24 horas as colônias foram submetidas à triagem por PCR, para a confirmação do inserto, as positivas foram selecionadas para purificação do DNA plasmidial.

5.5.4.4 Purificação de DNA plasmidial

Para obtenção de DNA plasmidial foi utilizado o *kit* Wizard Miniprep (Promega,USA). O crescimento bacteriano foi realizado em 10 mL de meio LB com ampicilina a 37°C por 16 horas. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada por 5 minutos a 5.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 250 μ L de solução de ressuspensão. Em seguida, foram adicionados 250 μ L de solução de lise e a mistura foi homogeneizada por inversão 4 vezes. Subsequentemente foram adicionados 10 μ L de solução de protease alcalina e a mistura foi homogeneizada quatro vezes e incubada por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 350 μ L de solução de neutralização e a mistura foi novamente homogeneizada por inversão e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e transferido para uma coluna contida em tubo coletor. Posteriormente, a coluna foi acoplada a um tubo de microcentrífuga e centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente. Foram adicionados 750 μ L de solução de lavagem na coluna que foi novamente centrifugada. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. O DNA

plasmidial foi eluído em 50 µL de água livre de nucleases e mantido a - 20°C, para posterior análise por PCR em tempo real.

5.5.4.5 Construção de curvas-padrão para a PCR em tempo real

O DNA plasmidial contendo o gene de *L. infantum*, foi utilizado para a construção da curva-padrão. Os vetores contendo os insertos foram inicialmente dosados (a 260 nm e 280 nm) utilizando o equipamento Nanovue (GE Healthcare Bio Sciences AB Sweden). A partir da dosagem obtida, calculou-se a concentração de DNA em µg/µL, de acordo com a fórmula:

$$\text{pmol}/\mu\text{L} = \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \frac{10^6 \text{pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{pmol}}{660 \text{pg}} \times \frac{1}{N}$$

Onde;

- N é o número de nucleotídeos (plasmídeo e inserto);
- 660 pg é a massa molecular média de um ácido nucléico.

Levando-se em consideração o número de Avogadro: 1mol = 6,02x10²³ moléculas, e sabendo que a concentração de cada solução de plasmídeo+inserto de interesse em pmol/µL, foi possível determinar o número de moléculas por microlitro de amostra. Depois de realizados estes cálculos, as amostras foram diluídas sucessivamente, sendo que aquelas contendo de 10⁷ até 10⁰ moléculas foram utilizadas para a construção da curva-padrão. As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp[®] Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA) no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC/CIPHARMA/UFOP). Além da curva padrão, o gene de referência G3PDH foi utilizado com o objetivo de verificar a integridade das amostras de DNA extraídas dos tecidos de cães (pele e baço). As amostras dos diferentes tecidos em estudo foram analisadas utilizando como gene alvo a DNA polimerase alfa.

Como controles positivos foram utilizadas as amostras diluídas do plasmídeo contendo o inserto utilizado na curva padrão; e como controle negativo foi usado água livre de nucleases. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (5 ng/μL); iniciadores (5 pmol/μL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μL por poço. As análises foram realizadas usando o software ABI SDS no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems), que permite avaliar: (i) a curva de dissociação; (ii) a intensidade de fluorescência da amostra; (iii) o número de ciclos em que a fluorescência cruza uma linha limiar arbitrária threshold (Ct) em cada ciclo e (iv) a quantificação do número de parasitos de acordo com a curva padrão (quantificação absoluta) (Figura 2). Neste trabalho, a reação de qPCR foi avaliada de forma qualitativa para sua comparação com as outras técnicas moleculares (PCRc e snPCR).

Curva de dissociação

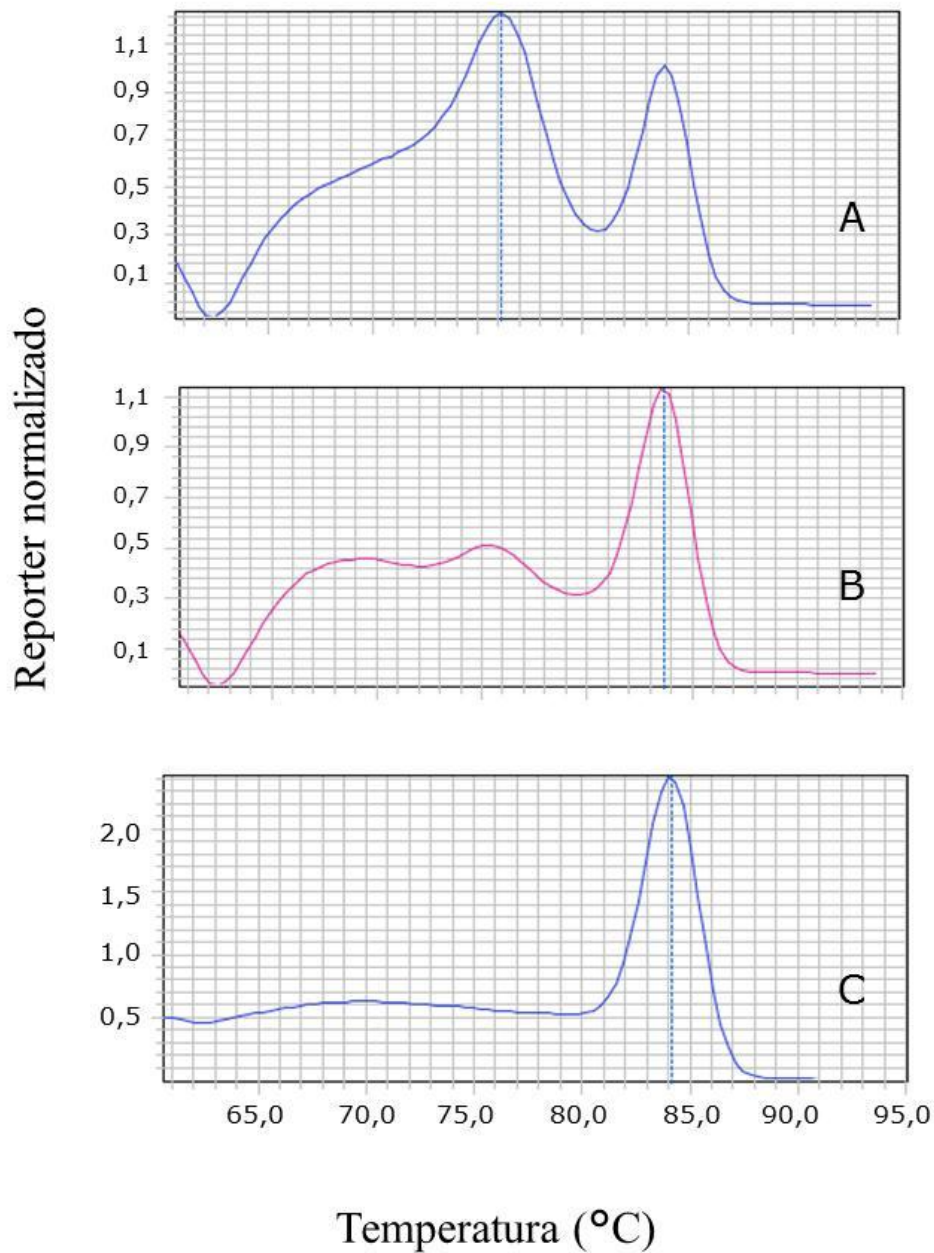


Figura 2: Curvas de dissociação de amostras de pele de cães naturalmente infectados. (A) Animal negativo ($T_m = 76,16$). (B) Animais com baixa carga (1 parasito) $T_m = 83,71$. (C) Animais com alta carga (4747 parasitos) $T_m = 84,17$. No eixo x está representada a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de qPCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 96-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,99$) (Figura 3).

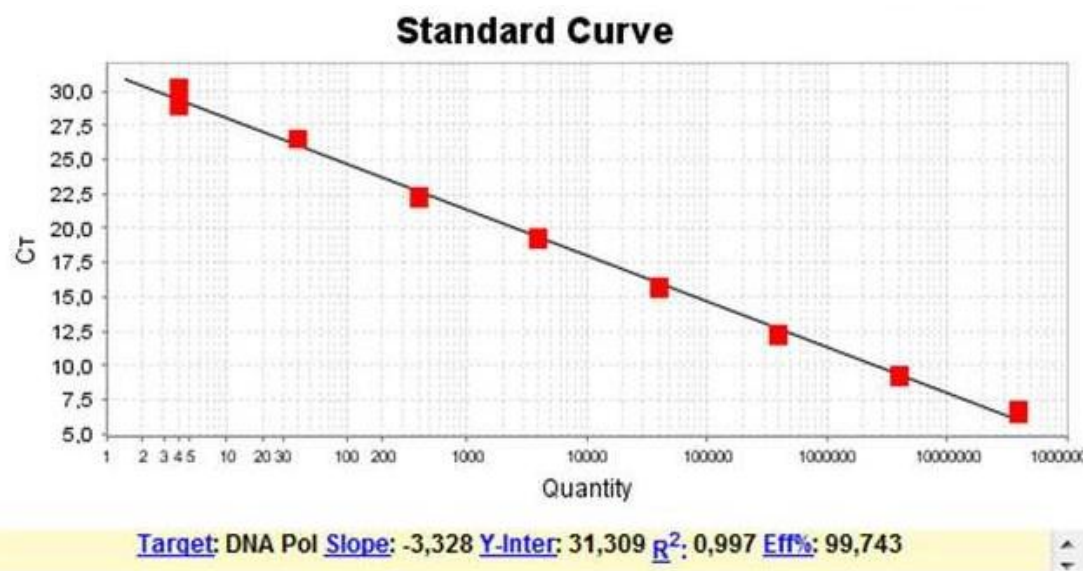


Figura 3: Exemplo da curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de *L. infantum* no sistema SYBR[®]-Green. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos (10⁷ a 10⁰) e em Y os valores de Ct correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,328), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,997$) e a eficiência (99,74%).

5.5.5 *Seminested* PCR (snPCR)

Os iniciadores LINR4, LIN17, e LIN19 foram utilizados para amplificar a região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Aransay et al. 2000). A combinação dos iniciadores em duas amplificações foi usada na técnica de snPCR, revelando um fragmento de 700 pares de base. A primeira reação de amplificação totalizou 5 μ L contendo 0,95 μ L de DreamTaq Green Mix 2x (Fermentas, USA), 1,0 mM LINR4, 0,2 mM LIN17, 2,5 μ L de DNA extraído, e 0,95 μ L de água Milli Q e acrescentado óleo mineral. A mistura descrita anteriormente foi incubada em um termociclador (Applied Biosystems) e as condições utilizadas na primeira reação da snPCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 17 ciclos a 94°C

por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A segunda reação de amplificação foi realizada adicionando 45 µL de uma solução contendo 20,25 µL de DreamTaq Green Mix 2x (Fermentas, USA), 1,0 mM LIN19 e 20,25 µL de água Milli Q ao volume total da reação da primeira amplificação. As condições utilizadas na segunda reação da snPCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 33 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após a segunda amplificação 5 µL do produto obtido foram ressuspendidos em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol 0,25% e 15% de ficol) e aplicados em gel de agarose 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada a 80V e 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM e EDTA a 2mM). Após a corrida, o gel foi corado com Brometo de Etídio e a banda de interesse foi visualizada em transluminador de raio UV.

5.5.6 Análises estatísticas

A análise de desempenho das técnicas moleculares foi realizada considerando como “padrão ouro” a cultura de aspirado medular em meio NNN/LIT em conjunto com o exame parasitológico direto realizado em lâminas de pele e baço. Os cálculos de sensibilidade, concordância, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram realizados usando o pacote estatístico Stata (versão 11.0, Stata Corporation, College Station, TX, USA). Como controles negativos foram utilizados fragmentos de pele e de baço provenientes de três cães não infectados do canil da UFOP, Ouro Preto.

6 RESULTADOS

6.1 PCRC e snPCR para o gênero *Leishmania*

Foi inicialmente determinada a concentração mínima de DNA necessária para a visualização de seu produto amplificado em gel de poliacrilamida 10% pela técnica de PCRC (Figura 4). Para isto, foi realizada a diluição seriada de uma amostra (pele e baço) sabidamente positiva nos exames parasitológicos. A banda de interesse corresponde ao fragmento de 120 pares de base. A partir do resultado obtido, foi estabelecida a concentração de DNA que seria utilizada em todas as reações de PCR e suas variações (snPCR e qPCR).

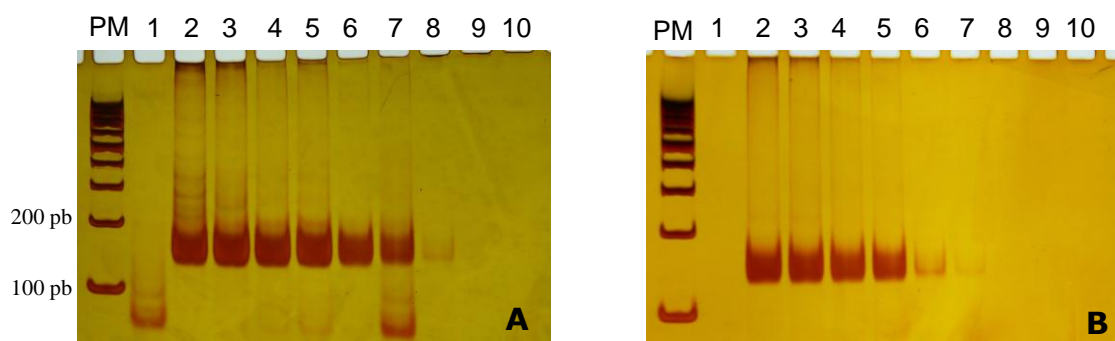


Figura 4: Produtos da PCRC separados por eletroforese e visualizados em gel de poliacrilamida 10%. PCR de DNA de pele (A) e baço (B) de cão naturalmente infectado em diferentes concentrações. PM= 100pb; Linha 1 corresponde ao controle negativo do mix (água); Linhas de 2-10 correspondem a 50 ng, 25 ng, 5 ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100fg e 10 fg de DNA respectivamente.

Para a realização da snPCR, o DNA de pele e de baço foram amplificados e visualizados em gel de agarose 1,5%. A banda de interesse corresponde ao fragmento de 700 pares de base (Figura 5). As amostras de cães não infectados provenientes do canil da UFOP foram utilizadas como controle negativo, e foi observada a ausência de amplificação do DNA na região de interesse.

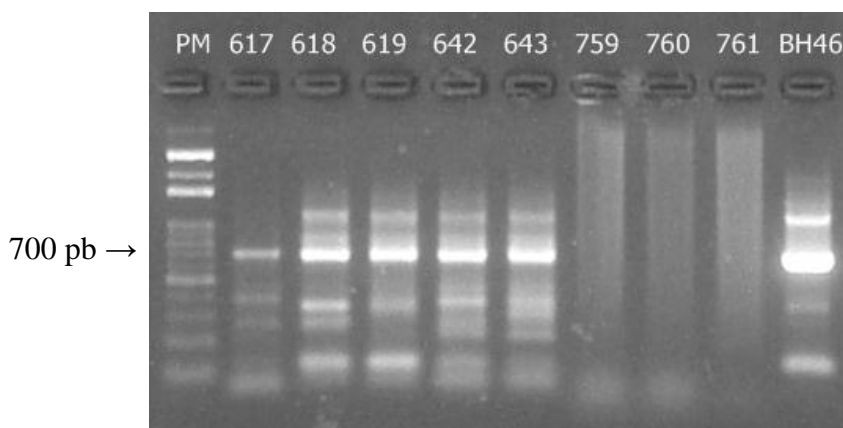


Figura 5: Fragmentos de 700 pb do kDNA de *Leishmania*, amplificados pela técnica de snPCR a partir de DNA extraído de amostras de pele de cães. PM – marcador de peso molecular 100 pb; 617 a 643 – DNA de pele de cães naturalmente infectados; 759 a 761 – DNA de pele de cães não infectados proveniente do canil da UFOP, Ouro Preto; BH46 – controle positivo de DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania*.

6.2 Avaliação comparativa do potencial diagnóstico de métodos moleculares na LVC em amostra de pele e de baço

Na primeira análise realizada neste trabalho foi avaliado, em cães soropositivos, naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas de LVC, o poder de detecção das três técnicas moleculares e dos métodos parasitológicos em diferentes tecidos. Avaliando as amostras de pele, foi observado que a técnica de snPCR foi a técnica molecular que detectou o menor número de cães infectados (71,7%), sendo capaz de detectar o mesmo número de cães que o diagnóstico parasitológico detectou no grupo de cães assintomáticos (9/ 20) . Nos animais assintomáticos, a positividade pela snPCR foi de 45,0% (9/20), já nos grupos oligossintomático e sintomático foi de 81,8% (18/22) e 88,9% (16/18) dos cães respectivamente. A PCRc apresentou resultado intermediário, entre as técnicas moleculares avaliadas, na capacidade de detectar o DNA de *Leishmania* spp. em amostras de pele. Foram diagnosticados 73,3% dos animais como infectados, sendo que o percentual de positivos por forma clínica foi de 60,0% (12/20), 68,2% (15/22) e 94,4% (17/18) nos grupos assinto, oligo e sintomático, respectivamente. A técnica de qPCR, em amostras de pele, foi a que apresentou melhores resultados, detectando 93,3% dos cães avaliados independentemente da forma clínica. Nos grupos de animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foram detectados 90,0% (18/20),

90,9% (20/22) e 100% (18/18) dos animais sororeativos, respectivamente. A qPCR foi a técnica com maior potencial diagnóstico em cães assintomáticos com 90,0% (18/20) de positividade em relação a PCRc com 60,0% (12/20) de positividade e a snPCR com 45,0% (9/20) de positividade (Tabela 2).

Nas amostras de baço também foi avaliada a positividade pelas técnicas moleculares descritas acima. Conforme observado na Tabela 2, a PCRc foi a técnica molecular que apresentou o menor percentual de positividade, detectando 73,3% dos animais. Sendo este valor idêntico ao obtido nas amostras de pele empregando a mesma técnica. De acordo com as formas clínicas o percentual de cães infectados detectados pela PCRc foi de 55,0% (11/20), 77,3% (17/22) e 88,9% (16/18) nos grupos assintomático, oligossintomático e sintomático, respectivamente. Um aumento no desempenho foi observado ao utilizar a técnica de snPCR, em amostras de baço, onde detectou-se 85,0% (51/60) dos cães infectados. Este percentual de detecção foi superior ao obtido em amostras de pele dos mesmos animais. De acordo com esta técnica, o percentual de positividade aumentou, de acordo com a forma clínica, sendo de 65,0% (13/20) nos animais assintomáticos, seguido de 90,9% (20/22) e 100% (18/18) nos grupos oligossintomático e sintomático, respectivamente. O melhor desempenho para o diagnóstico da LCV foi observado pela técnica qPCR em amostras de baço, pois esta técnica foi capaz de detectar a infecção em 100% (60/60) dos animais avaliados.

Tabela 2: Potencial diagnóstico de métodos moleculares na LVC, empregando amostra de pele de cães naturalmente infectados apresentando diferentes formas clínicas.

Formas Clínicas	Número de animais positivos/Total (%)		
	Pele		
	PCRc	snPCR	qPCR
Assintomáticos	12/20 (60,0)	9/20 (45,0)	18/20 (90,0)
Oligossintomáticos	15/22 (68,2)	18/22 (81,8)	20/22 (90,9)
Sintomáticos	17/18 (94,4)	16/18 (88,9)	18/18 (100,0)
Total	44/60 (73,3)	43/60 (71,7)	56/60 (93,3)

O diagnóstico parasitológico dos animais avaliados foi realizado pelo cultivo de aspirado medular em meio de cultura NNN/LIT e pela visualização direta de formas amastigotas do parasito em lâminas com *imprints* de pele e baço. A positividade nos

testes parasitológicos foi de 61,7% (37/60), sendo que, esta aumentou de acordo com a gravidade dos sinais clínicos da doença. No grupo de animais assintomáticos a positividade foi de 45,0% (9/20), já os grupos oligossintomático e sintomático apresentaram resultado parasitológico positivo em 63,6% (14/22) e 77,8% (14/18) dos animais avaliados, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Potencial diagnóstico de métodos moleculares na LVC em amostras de baço, e de testes parasitológicos em cães naturalmente infectados apresentando diferentes formas clínicas.

Formas Clínicas	Número de animais positivos/Total (%)			
	Baço			ΣTestes
	PCRc	snPCR	qPCR	Parasitológicos
Assintomáticos	11/20 (55,0)	13/20 (65,0)	20/20 (100,0)	9/20 (45,0)
Oligossintomáticos	17/22 (77,3)	20/22 (90,9)	22/22 (100,0)	14/22 (63,6)
Sintomáticos	16/18 (88,9)	18/18 (100,0)	18/18 (100,0)	14/18 (77,8)
Total	44/60 (73,3)	51/60 (85,0)	60/60 (100,0)	37/60 (61,7)

ΣTestes Parasitológicos: aspirado medular em meio de cultura NNN/LIT e parasitológico direto em pele e baço.

A positividade total nas amostras biológicas de acordo com a PCR e suas variações é representada na tabela 4.

Tabela 4: Positividade total da pele e de baço pelos métodos moleculares.

Amostra biológica	Número de animais positivos/Total (%)		
	PCRc	snPCR	qPCR
Pele	44/60 (73,3)	43/60 (71,7)	56/60 (93,3)
Baço	44/60 (73,3)	51/60 (85,0)	60/60 (100,0)

6.3 Avaliação do desempenho dos métodos moleculares.

Para analisar os índices de desempenho, foram utilizados amostras de pele e baço de um total de 37 cães que apresentaram exame parasitológico (padrão ouro) positivo em um dos métodos empregados no estudo (cultivo em meio NNN/LIT de

material obtido de medula óssea e *imprints* de pele e baço). A análise do desempenho dos métodos moleculares foi realizada avaliando os seguintes parâmetros: verdadeiro positivo (VP), falso negativo (FN), sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (Tabela 5). O cálculo de VPP e VPN foi realizado utilizando a prevalência da área de estudo. De acordo com Coura-Vital (2011) em Belo Horizonte, Minas Gerais, a prevalência de infecção por *L. infantum* é de 24% pela técnica de PCR-RFLP.

A técnica de PCRC nas amostras de pele dos cães naturalmente infectados, demonstrou que 33 amostras eram verdadeiros positivos e 4 amostras falsos negativos, de acordo com o padrão ouro. A sensibilidade da técnica de PCRC foi de 89,2%, o VPP foi de 36,0% e o VPN de 93,6%. Ao analisar a técnica de snPCR nas amostras de pele, foi observado que 32 amostras eram verdadeiros positivos e 5 amostras falsos negativos. A sensibilidade da técnica foi 86,5%, o VPP e o VPN foram 35,3% e 92,1%, respectivamente. A técnica de qPCR nas amostras de pele, obteve o melhor resultado, 36 amostras verdadeiros positivos e 1 amostra falso negativo. A sensibilidade foi de 97,3%, o VPP e o VPN foram de 38,1% e 98,3%, respectivamente.

Já a análise do desempenho da PCRC empregando amostras de baço obteve 30 amostras como verdadeiros positivos e 7 amostras falsos negativos. A sensibilidade da PCRC foi de 81,1%, o VPP e o VPN foram de 33,9% e 89,3%, respectivamente. O emprego da snPCR nas amostras de baço obteve 35 amostras como verdadeiros positivos e 2 amostras como falsos negativos. A sensibilidade da snPCR foi de 94,6%, o VPP e o VPN foi de 37,4% e 96,7%, respectivamente. A técnica de qPCR, da mesma forma que nas amostras de pele, apresentou o melhor desempenho em comparação às outras técnicas. Foi observado que 100% dos cães apresentaram resultado verdadeiro positivo (37) e a sensibilidade foi de 100%. Além disso, a qPCR em fragmentos de baço obteve um VPP e VPN de 38,7% e 100% respectivamente.

Tabela 5: Análises do desempenho dos métodos moleculares em comparação ao exame parasitológico.

Tecido	Métodos Moleculares	VP	FN	Sensibilidade (%) (95% IC ^a)	VPP (%)	VPN (%)
Pele	PCRc	33	4	89,2 (75,3-95,7)	36,0	93,6
	snPCR	32	5	86,5 (72,0- 94,1)	35,3	92,1
	qPCR	36	1	97,3 (86,2-99,5)	38,1	98,3
Baço	PCRc	30	7	81,1 (65,8-90,5)	33,9	89,3
	snPCR	35	2	94,6 (82,3- 98,5)	37,4	96,7
	qPCR	37	0	100 (90,6-100,0)	38,7	100,0

^a IC: intervalo de confiança.

VPP e VPN foram calculados usando a prevalência de 24% por PCR-RFLP (Coura-Vital et al. 2011).

VP = Verdadeiro Positivo; FN = Falso Negativo.

7 DISCUSSÃO

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral brasileiro baseiam-se em um tripé de ações que preconiza o tratamento das pessoas infectadas, aspersões de inseticida no domicílio e peridomicílio e a eutanásia de cães soropositivos. Apesar do intenso trabalho do Programa, estas medidas não têm alcançado bons resultados na redução dos casos humanos e caninos da doença (Palatnik-de-Sousa et al. 2001; Harhay et al. 2011). Somente na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, nos últimos 19 anos (1994-2012), mais de 25.000 cães foram eutanasiados por estarem infectados com *L. infantum*, sendo que neste mesmo período o total de casos de LVH foi de 1.568 casos (Harhay et al. 2011; PBH 2013). O Estado de Minas Gerais é o estado da Região Sudeste do Brasil com mais casos confirmados de LVH por ano, entre os períodos de 1990 e 2011. Os Estados de Ceará, Tocantins e Maranhão, foram os únicos Estados com mais casos confirmados de LVH do que o Estado de Minas Gerais (412 casos) no ano de 2011 (Sinan/SVS/MS 2012). Sendo assim, devido ao grande número de casos humanos, é notório que existem falhas nas medidas de controle da LV, e para melhorar a efetividade destas estratégias é necessário um sistema de vigilância permanente, com utilização extensiva de recursos humanos e financeiros, com maior sustentabilidade e cobertura (Costa et al. 2007). Alguns fatores que contribuíram e contribuem para a falha no PVC-LV se referem à eliminação do reservatório doméstico, devido a demora no diagnóstico e eutanásia dos animais infectados (Nunes et al. 2010), reposição quase imediata do cão por outros mais susceptíveis (Grimaldi et al. 2012a) e a acurácia dos métodos de diagnósticos adotados (Rosario et al. 2005; Grimaldi et al. 2012b).

Estudos que avaliam a prevalência da infecção canina em áreas endêmicas demonstram que os testes sorológicos subestimam as taxas de infecção quando comparadas as taxas detectadas pelos métodos moleculares (Solano-Gallego et al. 2001; Coura-Vital et al. 2011). Em um estudo de coorte conduzido no sul da Itália, foi observado uma subestimação do número de cães infectados, sendo a incidência pela *nested-PCR* maior que a detectada na sorologia. Neste trabalho 43 cães da raça Beagle foram acompanhados durante 32 meses e ao final do estudo, 97% destes cães expostos na área encontravam-se infectados (*nested-PCR* positivo), já pela sorologia 76% dos cães soroconverteram (Oliva et al. 2006). Durante um estudo transversal, realizado em Belo Horizonte, foi observado que a taxa de infecção canina por *L. infantum*, diagnosticada pela PCR-RFLP (24,7%), foi aproximadamente o dobro da detectada pelo

ELISA (15,9%) (Coura-Vital et al. 2011). Estes resultados demonstraram que a taxa de infecção canina em uma área urbana endêmica, sob intervenção do PVC-LV, têm sido subestimada. Outros estudos em áreas endêmicas também encontraram elevada prevalência de infecção (60-80%) pela PCR, sendo esta superior à sorologia (<30,0%) (Solano-Gallego et al. 2001a; Lachaud et al. 2002a; Leontides et al. 2002; Fernandez-Bellon et al. 2008). Os resultados encontrados nos estudos citados anteriormente reforçam que os métodos moleculares são mais sensíveis quando comparados aos métodos sorológicos, sendo necessária uma revisão destas metodologias empregadas rotineiramente.

Recentemente, por meio de uma Nota Técnica Conjunta N°01/2011, o Ministério da Saúde alterou a forma do diagnóstico canino pelo PVC-LV. Antes eram utilizados - ELISA como método de triagem e a RIFI como método confirmatório em sangue total em papel filtro, a nova conduta será a realização do teste rápido imunocromatográfico (DPP[®]) para triagem e o ELISA como teste confirmatório. Estudos recentes que avaliam o DPP[®] para o diagnóstico da LVC revelaram falhas na sensibilidade e na capacidade de detecção de cães assintomáticos utilizando este teste rápido. Grimaldi (2012) em um estudo prospectivo realizado em uma área endêmica de *L. infantum* concluiu que o DPP[®] apresentou baixíssima sensibilidade (47%) na identificação de cães assintomáticos com testes parasitológicos positivos, reforçando a falha na detecção da infecção. São necessários mais estudos avaliando o DPP[®] em áreas endêmicas, mas de acordo com este trabalho esta substituição, apesar de aparentemente ter resolvido uma questão logística do Programa incluindo neste um teste rápido, no que diz respeito à detecção de cães soropositivos observa-se um forte prejuízo, devido à elevada queda da sensibilidade fazendo com que cães assintomáticos parasitologicamente positivos sejam mantidos nas áreas endêmicas.

Para um melhor monitoramento e controle da LVC é necessário o emprego de testes diagnóstico com maior acurácia e capazes de identificar maior número de animais que podem ser fonte de infecção para o vetor, particularmente aqueles que se encontram numa janela entre o momento que foram infectados pelos vetores e o início da infecção assintomática (Courtenay et al. 2002b). Desta forma, a remoção destes animais reduziria a transmissão da doença pelos flebotomíneos. Outro problema enfrentado pelo PVC-LV, em relação ao diagnóstico sorológico, é a comercialização de vacina, como a Leishmune[®], que provoca a soroconversão do animal, dificultando sua diferenciação de

animais infectados (Andrade et al. 2009). Sendo assim, as técnicas moleculares surgem como alternativas para uma melhor detecção dos animais infectados, visto que são capazes de detectar o DNA do parasito ao invés dos anticorpos. Além disso, o diagnóstico molecular permite (i) o aumento da sensibilidade do ensaio com a otimização de protocolos e com a detecção do parasito mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos; (ii) utilização de grande variedade de amostras biológicas, como, sangue periférico, aspirados de linfonodo e medula óssea, pele, soro, urina, dentre outros e (iii) análise de materiais biológicos que normalmente ficam arquivados em laboratório, como esfregaços de medula óssea e biopsias de pele (Srividya et al. 2012).

Diversas metodologias com diferentes alvos têm sido utilizados para o diagnóstico da LV humana e canina. Dentre elas estão as que incluem iniciadores que amplificam genes do RNA ribossômico (Lachaud et al. 2000; Srivastava et al. 2011), da região do cinetoplasto (kDNA) (Salotra et al. 2001a; Cortes et al. 2004; Maurya et al. 2005), do RNA derivados do mini- exon e sequências genômicas repetidas (Kuhls et al. 2007), da região da β -tubulina (Akman et al. 2000; Dey e Singh 2007), da glicoproteína 63 (gp63) (Guerbouj et al. 2001; Quispe Tintaya et al. 2004) e dos espaços transcritos internos (ITS) (Schönian et al. 2003; Mauricio et al. 2004). Além da PCR convencional, há variações da técnica como a *seminested* PCR e a PCR em tempo real (Gomes et al. 2008; Maia & Campino 2008; Miro et al. 2008) e todas essas surgiram pelo aperfeiçoamento da técnica convencional, objetivando melhores resultados e maior otimização da técnica.

Dentre as técnicas utilizadas neste estudo, a PCR em tempo real é a mais avançada, por ser uma ferramenta que permite a automação, além de possibilitar a quantificação da carga parasitária e apresentar maior sensibilidade (Mortarino et al. 2004; Francino et al. 2006). Os primeiros estudos realizados utilizando esta técnica para o diagnóstico da Leishmaniose foram realizados por Nicolas (2002) e Svobodova (2003) e confirmaram o potencial da qPCR em quantificar a carga parasitária em tecidos de murinos. Posteriormente, foi padronizado o diagnóstico da LVC em sangue periférico, visando à utilização deste método na rotina laboratorial (Cavalcanti et al. 2009). Segundo Mortarino (2004) e Francino (2006), a qPCR, por sua elevada sensibilidade e especificidade, deveria ser utilizada para o diagnóstico da LVC, ao invés da PCR convencional. A qPCR é uma excelente técnica para o diagnóstico da LVC em áreas endêmicas, onde a maior parte da população canina é exposta ao parasito, mas

apenas uma pequena proporção desses animais desenvolvem a doença (Solano-Gallego et al. 2001). Nessas áreas endêmicas, é essencial a detecção precoce de animais infectados antes de tornarem-se potenciais reservatórios, visto que a capacidade de infectar os flebotomíneos ocorre aproximadamente 105 dias após sua soroconversão (Quinnell et al. 2001a; Courtenay et al. 2002b) e o PVC-LV geralmente realiza o inquérito canino duas vezes ao ano. A qPCR, possui como vantagens a possibilidade de automação e a produção rápida dos resultados, com diminuição do número de etapas em relação às outras técnicas moleculares, como a PCRc e a snPCR, o que reduz o risco de contaminação das amostras.

No presente estudo, avaliamos comparativamente a positividade de métodos moleculares e parasitológicos em fragmentos de pele e baço de animais com diferentes formas clínicas da LVC (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos). Em relação aos testes moleculares, a qPCR foi a técnica que apresentou a maior positividade, independente do tecido analisado e da forma clínica do animal. No baço a positividade foi maior que na pele, porém em ambos os tecidos a positividade aumentou com a o a gravidade dos sinais clínicos da doença. O aumento da positividade na pele e baço dos animais pode estar associada ao estágio clínico da LVC e com a carga parasitária presente nestes tecidos, como demonstrado pelos achados de Alves (2009), que encontraram uma correlação positiva entre a sintomatologia e a densidade parasitária tecidual. Sendo que a diferença na positividade entre a pele e o baço provavelmente está relacionada à resposta individual dos animais à evolução da doença, e ao fato dos parasitos não se distribuírem de forma homogênea em todos os tecidos (Maia & Campino 2008).

A pele é considerada um compartimento importante no contexto da LVC por apresentar elevado parasitismo tecidual funcionando como fonte de infecção para o vetor, tanto em cães assintomáticos como em sintomáticos (Abranches et al. 1991; Michalsky et al. 2007). Conforme observado por Pinelli (1994,1995) e Bourdoiseau (1997), os cães assintomáticos são mais resistentes do que os sintomáticos, provavelmente devido a uma ativação celular mais eficiente, resultando em um infiltrado inflamatório limitado. Estudo realizado por Xavier (2006) em pele de cães naturalmente infectados, comparou o diagnóstico da LVC por meio de imunohistoquímica, histologia e PCR convencional, utilizando os mesmos iniciadores do nosso estudo. A PCR foi a técnica que apresentou maior sensibilidade (82,8%)

quando comparada as outras técnicas, confirmando que o diagnóstico molecular pode ser a melhor metodologia para o diagnóstico da LVC em fragmentos de pele da orelha. Solano-Gallego (2001) ao avaliar diversos tecidos pela técnica de PCR observou que a pele é o compartimento que tem apresentando os melhores resultados (51%), seguido pela mucosa conjuntival (32%) e aspirados de medula óssea (17.8%). Entretanto, são escassos os estudos comparando técnicas moleculares em fragmentos de pele e baço de cães naturalmente infectados. A obtenção de fragmentos de pele possui como vantagem em relação a outros tecidos (como baço, fígado, linfonodo e medula óssea) de ser uma biopsia não invasiva, podendo ser útil em estudos epidemiológicos (Degraive et al. 1994; Strauss-Ayali et al. 2004).

O baço é considerando um dos principais órgãos afetados durante a LVC, pois é um local onde ocorre a migração de células infectadas com o parasito (Keenan et al. 1984). Alguns autores acreditam que a partir da infecção cutânea, o parasito pode ser disseminado através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, até a medula óssea, nódulos linfáticos, fígado e baço, bem como rins e o trato gastrointestinal (Tryphomas et al. 1977; Keenan et al. 1984a). Alterações no baço de cães portadores de LVC são bastante variáveis, os parasitos podem induzir uma desorganização na estrutura celular do órgão, com a hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha levando a esplenomegalias de graus variados (Alvar et al. 2004). Amusatogui (2003) aponta a esplenomegalia como a alteração mais comum em cães com LVC. Independente da presença de sinais clínicos, a pele e o baço são os principais locais que são encontrados os parasitos durante a infecção por *Leishmania infantum* (Reis et al. 2009). Alguns trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais assintomáticos apresentaram baixo parasitismo no baço, enquanto que animais sintomáticos apresentaram alta carga parasitária neste órgão e em vários outros tecidos (pele, medula óssea, fígado e linfonodo) (Reis, 2001; Reis et al. 2006a,b; Giunchetti et al. 2006, 2008a). Para a realização das técnicas moleculares neste tecido, podem ser utilizados fragmentos de baço (Solcá et al. 2011) e até mesmo aspirados de baço (Paranhos-Silva et al. 2003), este último, sem a necessidade da morte do animal.

A qPCR apresentou alta positividade na detecção dos animais assintomáticos na pele e no baço (90,0% e 100,0% respectivamente), em comparação às outras técnicas moleculares. Estes dados, demonstram a grande capacidade da qPCR em detectar o DNA do parasito em animais de área endêmica, infectados e sem sinais sugestivos de

LVC. Tem sido descrito que cães assintomáticos apresentam baixo parasitismo, enquanto cães sintomáticos são associados com alta carga parasitária em vários tecidos tais como a pele, medula óssea e baço (Reis et al. 2009). Além disso, Manna (2009) encontraram uma correlação positiva entre os escores clínicos e a quantidade média de parasitos no sangue e linfonodos de cães naturalmente infectados. O fato da qPCR apresentar uma alta positividade nos animais assintomáticos do nosso estudo, confirma que esta técnica pode ser capaz de detectar animais com carga parasitária extremamente baixas quando comparada com a PCRc (Francino et al. 2006). Cabe ressaltar que animais assintomáticos com baixas cargas também são considerados reservatórios do parasito como já mostrado por alguns autores que avaliaram a capacidade destes cães em infectarem flebotomíneos após xenodiagnóstico (Michalsky et al. 2007; Soares et al. 2011).

Em um recente estudo realizado em cães de área endêmica do Iran, foram analisadas técnicas de diagnóstico utilizando o soro desses cães e foi observado que a técnica de qPCR apresentou melhor desempenho que a PCRc em detectar animais assintomáticos sendo a taxa de positividade de 99,1% e 70,5%, respectivamente (Mohammadiha et al. 2013). Ao avaliarem os animais sintomáticos, a positividade da qPCR e da PCRc foi de 97,3% e 67,6%, corroborando com os nossos achados de que a qPCR é a melhor técnica molecular para detectar animais positivos independente da forma clínica. Esta diferença na positividade entre os grupos clínicos pode estar relacionada à resposta celular mais ativa em animais assintomáticos, o que ocasiona redução da replicação e carga parasitária, afetando consideravelmente a sensibilidade da PCRc. Solcá (2011) encontram um limite de detecção de 10 fg de DNA para PCRc em amostras da cepa de referência (*L. infantum*) misturados com fragmentos de baço de um cão saudável. Este limite de detecção corresponde a cerca de 0,03-0,1 parasitos por fragmento (Vitale et al, 2004;. Quaresma et al., 2009). No estudo feito por Francino (2006), a PCRc foi capaz de detectar pelo menos 30 parasitos/mL, enquanto a qPCR identificou 0,2 parasitos/mL em amostras de sangue ou medula óssea. Sendo assim, apesar dos valores de detecção serem extremamente baixos, os resultados de sensibilidade da PCR e da qPCR variam de acordo com o tecido utilizado.

Ramos (2012) compararam a positividade em cães de área endêmica por meio das técnicas de qPCR e PCRc em diferentes tecidos (baço, medula óssea e linfonodo) e seus resultados demonstraram uma positividade total em fragmentos de baço de 28,5%

(10/35 animais) para a PCRc e de 97,1% (34/35 animais) pela técnica de qPCR, o que também corrobora com nossos resultados. A grande diferença na positividade pelas técnicas moleculares podem ser justificadas por uma série de variáveis que afetam seu desempenho, como a quantidade de DNA a ser amplificado, o método empregado na extração do DNA, a presença de inibidores, a fragmentação do DNA, a passagem sucessiva de *amplicons* a partir de um tubo para o outro, protocolo de amplificação e a forma de detecção do material amplificado (Cortes et al. 2004; Baneth et al. 2008). Neste sentido, a qPCR possui vantagens em relação a PCRc e a snPCR, pois a reação é feita em um número menor de etapas, com protocolos de amplificação mais simples e a detecção do material amplificado não necessita de visualização em gel (agarose ou poliacrilamida), diminuindo os riscos de contaminação pelo manipulador e pelas próprias condições em que é feita a reação.

Outra técnica molecular avaliada no presente estudo foi a snPCR, e esta apresentou resultados discordantes de acordo com o tecido investigado. Ao analisar a pele a PCRc teve uma positividade total de 73,3% e a snPCR a positividade foi ligeiramente menor (71,7%). O contrário foi observado analisado o baço, no qual a técnica de snPCR teve uma positividade de 85,0% e a PCRc de 73,3%. Em ambos os tecidos a positividade da PCRc foi a mesma, porém a positividade da snPCR foi maior nas amostras de baço, possivelmente pela maior presença de DNA de *Leishmania spp* neste compartimento (Reis et al. 2006). Além disto, alguns autores admitem que o parasitismo cutâneo ocorra depois que a visceralização está estabelecida e se intensificando (Reis et al. 2009). Em um trabalho realizado por Silva (2012) eles comparam a PCRc e a snPCR em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A snPCR baseia-se em duas amplificações consecutivas, aumentando o risco de contaminação do material amplificado, tornando essa técnica pouco viável para o uso rotineiro no diagnóstico da LVC. Silva (2012) compararam três reações de PCR, sendo duas delas de PCRc e uma de snPCR, em amostras de pacientes com LTA. Em um dos ensaios a PCRc e a snPCR foram realizadas utilizando os mesmos iniciadores empregados no atual estudo, e a positividade encontrada por estes autores foi de 76,9% para a PCRc e de 69,2% para a snPCR. Em pacientes com LTA a probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após 1 ano (SVS-MS). Além disso, a região em que a biopsia foi realizada também pode interferir nos resultados, sendo que a utilização de biopsias de

pele e esfregaços por aposição (*imprints*) podem ser piores fontes de DNA quando comparadas a fragmentos de pele e baço de cães infectados com LVC, uma vez que estes órgãos apresentam elevada carga parasitária.

A diferença na positividade dos testes moleculares nas amostras de cães sororeativos confirma o que foi demonstrado por Baneth (2008), na qual resultados negativos pelo método de PCR em uma amostra clínica não são suficiente para descartar a infecção. Além disso, a positividade nos testes moleculares, em amostras de pele e baço, podem apresentar resultados variáveis e as vezes conflitantes devido à dinâmica do parasito nos diferentes órgãos do hospedeiro. De uma forma geral houve um aumento da positividade nos testes moleculares de acordo com a gravidade dos sinais sugestivos de LVC. Entre os cães sintomáticos houve maior número de resultados positivos que nos assintomáticos em ambos os tecidos analisados, indicando que a gravidade da doença favorece a detecção por estes métodos.

Ao comparar os métodos de diagnóstico moleculares com o método parasitológico utilizado como padrão-ouro, foi observado que os testes parasitológicos apresentaram menor positividade (61,7%) entre os animais analisados, o que reforça que os testes moleculares são melhores para detectar a infecção em comparação aos testes parasitológicos. Estes resultados foram confirmados por Moreira. (2007), que avaliaram amostras de aspirados de linfonodos e de medula óssea de cães naturalmente infectados, e concluíram que a técnica de PCRc é mais sensível do que a detecção por microscópica óptica de formas amastigotas ou cultura de parasitos. Em um estudo realizado por Moreira (2012) avaliando a infecção experimental em modelo hamster (*Mesocricetus auratus*), a qPCR demonstrou maior sensibilidade para a identificação de animais com baixa carga parasitária no baço e no fígado, em comparação com o método de LDU (*Leishman Donovan Units*). As técnicas moleculares além de serem mais sensíveis, possibilitam a detecção do DNA do parasito em pequenas quantidades na amostra biológica, possibilitando detectar valores tão baixos como 0,1 fentogramas de DNA do parasito (Quaresma et al. 2009). Em comparação às técnicas moleculares, os testes parasitológicos apresentam a sensibilidade com maior dependência da carga parasitária, além disso, os resultados demandam de longo tempo, de profissionais qualificados, tornando a sua execução em larga escala inviável logisticamente.

Quando avaliamos os resultados parasitológicos por forma clínica, observamos que a positividade é menor em animais assintomáticos em relação aos cães

sintomáticos, sendo que nos oligossintomáticos esta positividade é intermediária. Reis (2006) ao analisar amostras de baço e pele encontrou uma correlação positiva entre a densidade parasitária e o estado clínico da infecção, demonstrando que ao aumentar o número de sinais clínicos da LVC ocorre aumento no parasitismo tecidual. Este resultado confirma que os animais sintomáticos são as principais fontes de infecção para o vetor, apesar de serem mais rapidamente detectados e removidos pelo PVC-LV. Além disso, na pele, a carga parasitária e a resposta inflamatória estão diretamente relacionadas com a condição clínica dos animais (Giunchetti et al. 2006; Verçosa et al. 2008; Verçosa et al. 2012). Os animais assintomáticos, apesar de apresentarem menor carga parasitária, muitas vezes não são detectados pelos exames sorológicos convencionais permanecendo na área e se comportando como fonte de infecção (Molina et al. 1994; Guarga et al. 2000a; Courtenay et al. 2002).

Apesar de todos os animais avaliados serem sororeativos na ELISA e RIFI (Biomanguinhos/RJ), a sensibilidade das técnicas moleculares foram calculadas utilizando como padrão ouro os testes parasitológicos (isolamento, *imprint* de baço e pele). Como o padrão ouro utilizado é menos sensível que os testes sorológicos, a sensibilidade obtida é subestimada, entretanto é mais fidedigna que a obtida pela sorologia, que pode apresentar resultado falso positivo. Foram utilizados fragmentos de pele e baço de três animais não infectados, provenientes do canil de experimentação da UFOP como controle negativo, para o cálculo de especificidade das técnicas, sendo este de 100% para todas as técnicas (dados não mostrados). A utilização de um pequeno número de animais para controle negativo se deve a questões éticas, pois a realização de técnicas invasivas apenas para a obtenção de amostras sabidamente negativas não seria justificável.

Ao avaliar o desempenho dos métodos moleculares foi possível observar que nas amostras de pele a qPCR (97,3%) apresentou maior sensibilidade e maior número de animais verdadeiros positivos e VPN (98,3%). Os VPP(s) foram baixos, independente da técnica molecular utilizada e do tipo de tecido, pois seus valores foram calculados usando a prevalência de 24% obtida no estudo de Coura-Vital (2011) em Belo Horizonte, Minas Gerais, a mesma área do atual trabalho. A sensibilidade da PCRc nas amostras de pele foram maiores do que na snPCR, que foram de 89,2% e 86,5% respectivamente. Sendo assim, nas amostras de pele a melhor técnica molecular para ser empregada é a qPCR, seguida da PCRc e da snPCR, respectivamente.

Ao analisar o desempenho dos testes moleculares em fragmentos de baço, a qPCR também foi a técnica molecular com melhor sensibilidade, detectando todos os animais que tiveram testes parasitológicos positivos (37/60 animais), independente da forma clínica. A snPCR e a PCRC obtiveram sensibilidade de 94,6% e 81,1% respectivamente. Estes resultados discordam dos resultados encontrados por Solcá et al. (2011) que comparou as técnicas de qPCR e PCRC em amostras de baço de cães naturalmente infectados. Neste estudo, a sensibilidade da técnica de PCRC foi superior à encontrada pela qPCR, sendo estes de 88,9% e 83,3% , respectivamente. Além disso, os VPN para a técnica de PCRC foi de 91,7% e de 88% para a técnica de qPCR (Solcà et al. 2011), entretanto seus cálculos não levaram em conta a prevalência da região. Estas diferenças podem estar relacionadas à diferença na especificidade dos iniciadores utilizados, bem como ao protocolo de extração e de amplificação que divergem nos diferentes estudos e nos períodos de infecção dos animais avaliados.

De acordo com os resultados é possível concluir que em ambos os tecidos a qPCR é a técnica molecular que apresentou melhor desempenho para ser utilizada no diagnóstico de cães naturalmente infectados. Em amostras de baço a sensibilidade foi maior que nas amostras de pele, porém a sensibilidade das amostras de pele também foi satisfatória e a sua coleta, visando sua utilização em áreas endêmicas, é mais viável, pois a pele é um tecido de mais fácil acesso e sua obtenção é menos invasiva. Uma das principais preocupações em torno da utilização de aspirado de baço é o risco de hemorragia grave ou até mesmo a morte (Léveillé et al. 1993) do animal, o qual pode ser contornado utilizando técnicas como a ultrassonografia abdominal (da Silva et al. 2012b), minimizando assim o risco para a animal. A punção aspirativa do baço, sem o auxílio de ultrassonografia abdominal, necessita de um profissional veterinário com experiência e com profundo conhecimento de anatomia canina (Barrouin-Melo et al. 2004), o que inviabiliza sua utilização em larga escala. É importante ressaltar, ao contrário do que se pensa até então, que atualmente as técnicas moleculares não são tão laboriosas e o custo vêm diminuindo devido ao aumento do uso para o diagnóstico na rotina do laboratório clínico. Já existem reagentes de diversas marcas no mercado, vários procedimentos para extração de DNA foram padronizados e também uma gama de protocolos de amplificação. Estes fatores vêm contribuindo para simplificar, diminuir os custos e agilizar a obtenção dos resultados baseados em técnicas moleculares, tornando este tipo de análise mais acessível em laboratórios de pesquisa.

Portanto, com base em nossos resultados podemos reforçar que a utilização de testes moleculares em especial a qPCR em amostras de pele seria muito útil para o diagnóstico da LVC, contribuindo para a melhoria das ações efetuadas pelos PVC-LV.

8 CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtidos neste trabalho que avaliou o potencial de técnicas moleculares (PCR convencional, *seminested* PCR e PCR em tempo real) no diagnóstico da LVC, empregando diferentes tecidos, permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- ✓ Os métodos moleculares obtiveram maior positividade em comparação aos métodos de diagnóstico parasitológicos;
- ✓ A positividade nos testes moleculares aumenta de acordo com a gravidade dos sinais clínicos;
- ✓ A qPCR foi a técnica molecular com maior positividade e melhores valores de desempenho (sensibilidade, VPP e VPN), independente do tecido;
- ✓ O tecido recomendado para a realização da qPCR em cães naturalmente infectados com *L. infantum* é a pele.

9 REFERÊNCIAS

Akman, L.; Aksu, H. S.; Wang, R. Q. et al. Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *The Journal of eukaryotic microbiology*, v. 47, n. 6, p. 545–54.

Almeida Ferreira, S. de; LeitE, R. S.; Ituassu, L. T. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.

Almeida, M. A. O.; Jesus, E. E. V.; Sousa-Atta, M. L. B. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary parasitology*, v. 127, n. 3-4, p. 227–32, 2005.

Alvar, Jorge; Cañavate, C.; Molina, Ricardo; Moreno, J.; Nieto, Javier. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 57, p. 1–88, 2004.

Alvar, Jorge; Vélez, I. D.; Bern, C. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

Alves W 2006, Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino, In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis sobre leishmaniose visceral en las Américas. *Organización Panamericana de salud*, Rio de Janeiro, pp. 94- 98.

Alves, Cíntia F; Amorim, I. F. G. de; Moura, E. P. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 4, p. 349–58, 2009.

Andrade, A. M.; Queiroz, L. H.; Nunes, G. R.; Perri, Sílvia Helena Venturoli; Nunes, C. M. [Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 594–5, 2007.

Andrade, R. A.; Silva Araújo, M. S.; Reis, Alexandre Barbosa; et al. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when

distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 79–86, 2009.

Aransay, A M.; Scoulica, E.; Tselentis, Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 5, p. 1933–8, 2000.

Araújo, V. E. M. de; Morais, M. H. F.; Reis, I. A.; Rabello, A.; Carneiro, M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 2, p. e1511, 2012.

Ashford, D. A.; David, J R; Freire, M. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 59, n. 1, p. 53–7, 1998.

Babakhan, L.; Mohebbali, Mehdi; Akhoundi, Behnaz; Edrissian, G. H.; Keshavarz, H. Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitology research*, v. 105, n. 3, p. 717–20, 2009.

Baneth, Gad; Koutinas, A. F.; Solano-Gallego, Laia; Bourdeau, Patrick; Ferrer, Lluís. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.

Barbosa-de-Deus, R.; Mares-Guia, M. L. dos; Nunes, A. Z. et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 9, n. 6, p. 1361–6, 2002.

Barrouin-Melo, S. M.; Larangeira, D. F.; Trigo, J. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of Leishmania chagasi infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 195–7, 2004.

Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C.; Hoareau, E. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 59, n. 1-2, p. 21–30, 1997.

Braga, M. D.; Coêlho, I. C.; Pompeu, M. M. et al. [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 5, p. 419–24, 1998.

Brasil 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 1th ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf Accessed December 12.

Cabrera, G. P.; Silva, V. O. da; Costa, R T da; et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 61, n. 2, p. 296–301, 1999.

Carvalho, J.K.M.R 2009. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e de diagnóstico. Campo Grande, MS. Chang KP. (1981). Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg*; 30:322—33.

Cortes, S.; Rolão, N.; Ramada, J; Campino, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 1, p. 12–7, 2004.

Costa, C. H.; Pereira, H. F.; Araújo, M. V. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. *Revista de saúde pública*, v. 24, n. 5, p. 361–72, 1990.

Costa, C. H.; Vieira, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 223–8, 2001..

Costa, Carlos Henrique Nery. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 232–242, 2011.

Coura-Vital, W.; Marques, Marcos José; Veloso, V. M. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C 2002b. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186: 1314-1320.

Courtenay, O; Kovacic, V.; Gomes, P. A. F.; Garcez, L M; Quinnell, R J. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. *Medical and veterinary entomology*, v. 23, n. 3, p. 245–56, 2009.

Curi, N. H. de A.; Miranda, I.; Talamoni, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 99–101, 2006.

Dantas-Torres F 2006. [Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 40: 537-541.

Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP 2006. [Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 352-356.

Deane LM 1956. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 162 pp.

Deane LM, Deane MP 1962a. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 198-212.

Degrave, W.; Fernandes, O; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 463–9.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.

Dey, A.; Singh, S. Genetic heterogeneity among visceral and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis strains from eastern India. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 7, n. 2, p. 219–22, 2007.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 25: 1240-1242.

Dye C 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55: 125-130.

Evans, T. G.; Vasconcelos, I. A.; Lima, J. W. et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 42, n. 2, p. 118–23, 1990.

Falqueto, A; Coura, J. R.; Barros, G. C. et al. [Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 2, p. 155–63, 1986.

Fernández-Bellon, H.; Solano-Gallego, L; Rodríguez-Cortés, A. et al. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Veterinary parasitology*, v. 155, n. 1-2, p. 32–6, 2008.

Ferroglio, E.; Poggi, M.; Trisciuglio, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses and public health*, v. 55, n. 3, p. 145–8, 2008.

Foglia Manzillo, V.; Oliva, G; Pagano, A. et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary parasitology*, v. 142, n. 1-2, p. 142–5, 2006.

Francino, O.; Altet, L.; Sánchez-Robert, E. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 137, n. 3-4, p. 214–21, 2006.

França-Silva, João C; Barata, Ricardo A; Costa, Roberto T da; et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 131, n. 3-4, p. 213–20, 2005.

França-Silva, João C; Costa, Roberto T da; Siqueira, A. M. 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. 161–73, 2003.

Garg, R.; Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, v. 123, n. 3, p. 439–54, 2006.

Gebre-Michael, T.; Pratlong, F.; Lane, R. P. *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *duboscqi* (Diptera: Phlebotominae), naturally infected with *Leishmania major* in southern Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 1, p. 10–1, 1993.

Giunchetti, R C; Mayrink, W; Genaro, O; et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of comparative pathology*, v. 135, n. 2-3, p. 100–7, 2006.

Giunchetti, Rodolfo Cordeiro; Corrêa-Oliveira, Rodrigo; Martins-Filho, O. A. et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, v. 26, n. 5, p. 623–38, 2008.

Gomes, Y. M.; Paiva Cavalcanti, M.; Lira, R. A.; Abath, F. G. C.; Alves, L C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary journal* (London, England : 1997), v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.

Gontijo CMF, Melo MN 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.

Gradoni, L.; Gramiccia, M; Scalone, A. [Change in human visceral leishmaniasis treatment in Italy: retrospective study of 630 patients]. *Parasitologia*, v. 46, n. 1-2, p. 199–201, 2004.

Grimaldi, G.; Teva, A.; Ferreira, A. L. 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, n. 1, p. 54–9, 2012. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Grimaldi, G.; Teva, A.; Santos, C. B.; Ferreira, A. L.; Falqueto, Aloísio. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 86, n. 6, p. 966–71, 2012.

Guarga, J. L.; Lucientes, J.; Peribáñez, M. A. et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta tropica*, v. 77, n. 2, p. 203–7, 2000.

Guerbouj, S.; Victoir, K.; Guizani, I. et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology*, v. 122 Pt 1, p. 25–35, 2001.

Hamarsheh, O.; Nasereddin, Abedalmajeed; Damaj, S. et al. Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. *Parasites & vectors*, v. 5, p. 183, 2012.

Harhay, M. O.; Oliaro, P. L.; Costa, D. L.; Costa, Carlos Henrique Nery. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in parasitology*, v. 27, n. 9, p. 403–9, 2011. Elsevier Ltd.

Keenan, C. M.; Hendricks, L. D.; Lightner, L.; Johnson, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Veterinary pathology*, v. 21, n. 1, p. 80–6, 1984.

Khademvatan, S.; Neisi, N.; Maraghi, S.; Saki, J. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 105, n. 8, p. 559–65, 2011.

Killick-Kendrick, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, v. 17, n. 3, p. 279–89, 1999.

Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M.; Focheux, C. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and veterinary entomology*, v. 11, n. 2, p. 105–11, 1997.

Kubista, Mikael; Andrade, J. M.; Bengtsson, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

Kuhls, K.; Keilonat, L.; Ochsenreither, S. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 9, n. 3, p. 334–43, 2007.

Lachaud, L.; ChabberT, E.; Dubessay, P. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v. 125, n. Pt 3, p. 197–207, 2002.

Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*,. In, W. Peters & R. Killick-Kendrick ed., London : Academic Press, p. 120.

Lemos, E. M.; Laurenti, M. D.; Moreira, M. A. B. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta tropica*, v. 107, n. 2, p. 205–7, 2008.

Lemrani, M.; Nejjar, R.; Pratlong, F. A new *Leishmania tropica* zymodeme--causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 96, n. 6, p. 637–8, 2002.

Lima, V. M. F. de; Fattori, K. R.; Michelin, A. de F.; Silveira Neto, L. da; Vasconcelos, R. de O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, v. 173, n. 3-4, p. 330–3, 2010.

Lombardo, G.; Pennisi, Maria Grazia; Lupo, T. et al. 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. 10–7, 2012.

Léveillé, R.; Partington, B. P.; Biller, D. S.; Miyabayashi, T. Complications after ultrasound-guided biopsy of abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 203, n. 3, p. 413–5, 1993.

Maia, C; Campino, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary parasitology*, v. 158, n. 4, p. 274–87, 2008.

Maia, Carla; Nunes, M.; Cristóvão, J.; Campino, Lenea. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta tropica*, v. 116, n. 3, p. 193–9, 2010.

Maia, Carla; Ramada, João; Cristóvão, J. M.; Gonçalves, L.; Campino, Lenea. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary journal* (London, England : 1997), v. 179, n. 1, p. 142–4, 2009.

Mancianti, F.; Gramiccia, M; gradoni, L.; Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 566–7, 1988.

Manna, Laura; Reale, Stefano; Vitale, Fabrizio; Gravino, A. E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in veterinary science*, v. 87, n. 1, p. 76–8, 2009.

Mauricio, I. L.; Stothard, J. R.; Miles, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology*, v. 128, n. Pt 3, p. 263–7, 2004.

Maurya, R.; Singh, R. K.; Kumar, B. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 7, p. 3038–41, 2005.

Michalsky, E. M.; Rocha, M. F.; Rocha Lima, A. C. V. M. DA; et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary parasitology*, v. 147, n. 1-2, p. 67–76, 2007..

Miró, Guadalupe; Cardoso, Luis; Pennisi, Maria Grazia; Oliva, Gaetano; Baneth, Gad. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 8, p. 371–7, 2008.

Mohammadiha, A.; Haghighi, A.; Mohebbali, M; et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Veterinary parasitology*, v. 192, n. 1-3, p. 83–90, 2013.

Molina, R; Amela, C.; Nieto, J; et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 4, p. 491–3, 1994.

Morales-Yuste, M.; Morillas-Márquez, F.; Díaz-Sáez, V. et al. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitology research*, v. 111, n. 1, p. 155–64, 2012.

Moreira, E. D.; Mendes De Souza, V. M.; Sreenivasan, M.; Nascimento, Eliane Góes; Pontes De Carvalho, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary parasitology*, v. 122, n. 4, p. 245–52, 2004.

Moreira, N. D. D., Vitoriano-Souza, J., Roatt, B. M., Vieira, P. M. D. A., Ker, H. G., de Oliveira Cardoso, J. M., Giunchetti, R. C., Carneiro, C.M., de Lana, M, Reis, A.B. (2012). Parasite burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (*Leishmania*) *infantum*: “Leishman Donovan units” versus real-time PCR. *PloS one*, 7(10), e47907.

Moreno, J.; Alvar, Jorge. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

Mortarino, M.; Franceschi, A.; Mancianti, F. et al. [Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*]. *Parasitologia*, v. 46, n. 1-2, p. 163–7, 2004.

Muccio, T. Di; Veronesi, F.; Antognoni, M. T. et al. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 8, p. 2651–9, 2012.

Nicolas, L.; Milon, G.; Prina, E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of microbiological methods*, v. 51, n. 3, p. 295–9, 2002.

Nunes, C. M.; Pires, M. M.; Silva, K. M. Da; et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary parasitology*, v. 170, n. 1-2, p. 131–3, 2010.

Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, v. 46, n. 1, p. 39–51, 1998.

Oliveira, Fernanda S; Pirmez, C.; Pires, Marize Q; Brazil, Reginaldo P; Pacheco, Raquel S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 129, n. 3-4, p. 219–27, 2005.

Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Diggs, C. L.; Hockmeyer, W. T. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 3, p. 425–6, 1983.

Paranhos-Silva, M.; Oliveira, G. G. S.; Reis, E. A. et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary parasitology*, v. 114, n. 2, p. 97–111, 2003.

Pinelli, E.; Gonzalo, R. M.; Boog, C. J. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European journal of immunology*, v. 25, n. 6, p. 1594–600, 1995.

Pinelli, E.; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and immunity*, v. 62, n. 1, p. 229–35, 1994.

Porrozzi, R.; Santos Da Costa, M. V.; Teva, A. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial

antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and vaccine immunology* : CVI, v. 14, n. 5, p. 544–8, 2007.

Quaresma, P. F.; Murta, S. M. F.; Ferreira, E. D. C. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta tropica*, v. 111, n. 3, p. 289–94, 2009.

Queiroz, N. M. G. P. De; Silveira, R. C. V. Da; Noronha, A C. F. De; et al. Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. *Veterinary parasitology*, v. 178, n. 1-2, p. 1–8, 2011. Elsevier B.V.

Quinnell, R J; Courtenay, O; Davidson, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, v. 122, n. Pt 3, p. 253–61, 2001.

Quinnell, Rupert J; Carson, C.; Reithinger, Richard; Garcez, Lourdes M; Courtenay, Orin. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

Ramos, R. A. Do N.; Ramos, C. A. Do N.; Jusi, M. M. G. et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, v. 21, n. 3, p. 192–5.

Reale, S; Maxia, L.; Vitale, F. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical ...*, v. 37, n. 9, p. 2931–5, 1999.

Reis, Alexandre B; Martins-Filho, Olindo A; Teixeira-Carvalho, A. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

Reis, Alexandre B; Teixeira-Carvalho, A.; Vale, A. M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian

dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 112, n. 3-4, p. 102–16, 2006.

Reis, Alexandre Barbosa; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009a.

Reis, Alexandre Barbosa; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009b.

Reithinger, R; Lambson, B. E.; Barker, D. C.; Davies, C. R. Use of PCR to detect Leishmania (Viannia) spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n. 2, p. 748–51, 2000.

Reithinger, Richard; Dujardin, J.; Louzir, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. ,2007.

Rosário, E. Y. Do; Genaro, Odair; Franca-Silva, J. C. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.

Safi, S. H. El; Evans, D. A. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n. 3, p. 334–7, 1989.

Savani, E. S. M. M.; Oliveira Camargo, M. C. G. De; Carvalho, M. R. De; et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (Felix catus) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 120, n. 3, p. 229–33, 2004.

Schönian, G.; Nasereddin, Abedelmajeed; Dinse, N. et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 47, n. 1, p. 349–58, 2003.

Silva, A. R. Da; Tauil, P. L.; Cavalcante, M. N. S. et al. [Epidemiological situation of visceral leishmaniasis on the Island of São Luis, State of Maranhão]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 358–64, 2008.

Silva, D. A. D.; Madeira, M. D. F.; Abrantes, T. R.; Filho, C. J. D. L. B.; Figueiredo, F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary journal* (London, England : 1997), p. 2011–2012, 2012.

Silva, E. S. Da; Meide, W. F. Van Der; Schoone, G. J. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary research communications*, v. 30, n. 6, p. 637–43, 2006.

Solano-Gallego, L; Koutinas, A; Miró, G; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

Solano-Gallego, L; Morell, P. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of clinical ...*, v. 39, n. 2, p. 560–3, 2001.

Solano-Gallego, Laia; Miró, Guadalupe; Koutinas, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, v. 4, p. 86, 2011.

Solcà, M. D. S.; Guedes, C. E. S.; Nascimento, Eliane Gomes; et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary parasitology*, v. 184, n. 2-4, p. 133–40, 2011.

Srividya, G.; Kulshrestha, A.; Singh, R.; Salotra, Poonam. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology research*, v. 110, n. 3, p. 1065–78, 2012.

Tryphonas, L.; Zawidzka, Z.; Bernard, M. A.; Janzen, E. A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Canadian journal of*

comparative medicine. *Revue canadienne de médecine comparée*, v. 41, n. 1, p. 1–12, 1977.

Vieira, J. B.; Coelho, G. E. [Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31 Suppl 2, p. 85–92, 1998.

Vitale, F; Reale, S; Vitale, M. et al. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1026, p. 139–43, 2004.

Weirather, J. L.; Jeronimo, S. M. B.; Gautam, S. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 11, p. 3892–904, 2011.

Werneck, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2937–40, 2008.

Werneck, G. L.; Costa, Carlos H N; Walker, A. M. et al. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, v. 13, n. 3, p. 364–7, 2002.

WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184.

Wortmann, G.; Sweeney, C.; Houg, H. S. et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 65, n. 5, p. 583–7, 2001.

Xavier, S. C.; Andrade, H. M. De; Monte, S. J. H. 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, p. 17, 2006.