

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**OTIMIZAÇÃO DE ENSAIOS DE PCR PARA A DETECÇÃO  
ESPECÍFICA DE *Leishmania chagasi***

Oswaldo José da Silveira Neto

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA

2010

**OSVALDO JOSÉ DA SILVEIRA NETO**

**OTIMIZAÇÃO DE ENSAIOS DE PCR PARA A DETECÇÃO  
ESPECÍFICA DE *Leishmania chagasi***

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal junto à Escola  
de Veterinária da Universidade  
Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Orientador:**

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Prof. Dra. Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)**

**GPT/BC/UFG**

Silveira Neto, Osvaldo José da.

Otimização de ensaios de PCR para a detecção específica de *Leishmania chagasi* [manuscrito] / Osvaldo José da Silveira Neto. - 2010.

xii, 58 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. *Canis familiares* 2. Reação em cadeia da polimerase  
3. *Leishmania chagasi*. I. Título.

CDU: 619:636.7:616.928.5

**OSVALDO JOSÉ DA SILVEIRA NETO**

Dissertação defendida e aprovada em **24/02/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



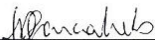
---

Ptof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares  
(ORIENTADOR (A))



---

Profa. Dra. Miriam Cristina Leandro Dorta - IPTSP/UFG



---

Dra. Débora Pereira Garcia Melo - Bolsista CAPES/PNPD/UFG

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais  
e aos meus irmãos, por todo apoio,  
incentivo, paciência e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho, por me dar forças e a calma necessária para continuar. Obrigado por permitir a conclusão de mais esta etapa em minha vida.

Tenho muito a agradecer ao meu orientador Guido Fontgalland Coelho Linhares, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, paciência e disponibilidade em repassar seus conhecimentos. É muito gratificante ter a oportunidade de conviver com um exemplo de profissional, de competência e humildade. Obrigado por ouvir minhas idéias, pela orientação e pela confiança.

A minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu tivesse a melhor formação possível, sempre me incentivando e apoiando. Ao meu pai, pelo apoio, dedicação e ensinamentos.

A minha irmã, por todo apoio e participação em minha caminhada, por estar sempre disposta a ajudar, e pela imensa paciência e compreensão. Ao meu irmão pelo apoio e paciência.

Aos meus amigos Raphael, Fabrício, Válter e Hélio, pelo companheirismo desde a graduação, por compartilharem os momentos de alegrias e dificuldades, fazendo com que o caminho ficasse mais fácil.

Agradeço a Sabrina Castilho Duarte, por todo apoio, amizade e imensa disposição em ajudar durante todo o período do mestrado, nas reações de PCR e em todo experimento. Muito obrigado.

Aos professores da Escola de Veterinária Francisco de Carvalho Dias Filho, Valéria de Sá Jayme e Maria Auxiliadora Andrade pelo apoio constante e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas da Pós-graduação, especialmente a Hérika, José Carlos, Elisa, Hilari e Fábio.

Aos Funcionários da Escola de Veterinária da UFG, especialmente Cícera, Gérson, Tiago, João Cunha, Sr. Inácio e Antônio.

Agradeço a Professora Dra. Miriam Cristina Leandro Dorta do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, pela imensa contribuição a realização deste trabalho, através do fornecimento das amostras de DNA de referência de *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

A Professora Dra. Rosângela Zacarias Machado, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, por nos fornecer DNA de referência pra *L. chagasi*, contribuindo para a execução deste projeto.

A Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade e pela formação.

A todos que me ajudaram de alguma forma, amigos e familiares que sempre torçeram por mim, meu muito obrigado!

## EPÍGRAFE

“ A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

## SUMÁRIO

<b>1 . INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1 Histórico .....	5
2.2 Etiologia.....	6
2.3 Reservatórios e vetores.....	7
2.4 Patogenia e sinais clínicos .....	7
2.5 Medidas de controle e prevenção da leishmaniose visceral.....	8
2.6 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina .....	9
2.6.1 Diagnóstico parasitológico.....	9
2.6.2 Diagnóstico sorológico .....	10
2.6.3 Diagnóstico molecular .....	12
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Objetivos gerais.....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 Local e período de realização .....	19
4.2 Obtenção de amostras de DNA referência.....	19
4.3 Construção de <i>iniciadores</i> .....	20
4.4 Ensaio de PCR .....	21
4.5 Controles para as reações de PCR.....	22
4.6 Otimização dos ensaios de PCR.....	22
4.7 Avaliação da especificidade analítica dos oligonucleotídeos .....	22
4.8 Determinação e avaliação da sensibilidade analítica das reações.....	23
4.9 Avaliação de <i>iniciadores</i> e protocolos descritos por outros autores .....	23
4.10 Leitura das reações de PCR .....	24
4.11 Documentação fotográfica.....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1 Construção de <i>iniciadores</i> .....	26
5.2 Avaliação de <i>iniciadores</i> e otimização de ensaios de PCR.....	30
5.3 Avaliação de <i>iniciadores</i> e protocolos descritos na literatura .....	34

5.4 Avaliação da especificidade analítica dos novos oligonucleotídeos.....	41
5.5 Avaliação da sensibilidade analítica dos novos ensaios de PCR.....	44
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1-** Alinhamento da região correspondente ao gene LSU RNAr de *L. chagasi* (acesso GenBank AJ000306), *L. lainsoni* (DQ182542), *L. naiffi* (DQ182543), *L. amazonensis* (FJ753373), *L. braziliensis* (FJ753385) e *L. guyanensis* (FJ753390), com localização do iniciador *foward* espécie-específico LCL1 (caixa com bordas azuis).....26

**FIGURA 2-** Alinhamento da região correspondente ao gene LSU RNAr de *L. chagasi* (AJ000306), *L. lainsoni* (DQ182542), *L. naiffi* (DQ182543), *L. amazonensis* (FJ753373), *L. braziliensis* (FJ753385) e *L. guyanensis* (FJ753390), com localização do iniciador *foward* espécie-específico LCL2 (caixa com bordas verdes).....26

**FIGURA 3-** Alinhamento da região correspondente ao gene LSU RNAr de *L. chagasi* (acesso GenBank AJ000306), *L. lainsoni* (acesso GenBank DQ182542), *L. naiffi* (acesso GenBank DQ182543), *L. amazonensis* (acesso GenBank FJ753373), *L. braziliensis* (acesso GenBank FJ753385) e *L. guyanensis* (acesso GenBank FJ753390), com localização do iniciador *reverse* espécie-específico LCL3 (caixa com bordas vermelha).....27

**FIGURA 4-** Alinhamento da região correspondente ao gene LSU RNAr de *L. chagasi* (acesso GenBank AJ000306), *L. lainsoni* (acesso GenBank DQ182542), *L. naiffi* (acesso GenBank DQ182543), *L. amazonensis* (acesso GenBank FJ753373), *L. braziliensis* (acesso GenBank FJ753385) e *L. guyanensis* (acesso GenBank FJ753390), com localização do iniciador *reverse* gênero - específico LCL4 (caixa com bordas roxas).....27

**FIGURA 5-** Alinhamento do gene 18S RNAr de *L. chagasi* (U42465), *L. infantum* (GQ332359), *L. donovani* (GQ332356) , *L. guyanensis* (GQ332358), *L. amazonensis* (GQ332354) e *L. braziliensis* (GQ332355) com localização do iniciador *foward* espécie-específico LCS1 (caixa com bordas azuis).....28

**FIGURA 6-** Alinhamento do gene 18S RNAr de *L. chagasi* (U42465), *L. infantum* (GQ332359), *L. donovani* (GQ332356) , *L. guyanensis* (GQ332358), *L. amazonensis* (GQ332354) e *L. braziliensis* (GQ332355) com localização do iniciador *foward* espécie-específico LCS2 (caixa com bordas laranjas).....28

**FIGURA 7-** Alinhamento do gene 18S RNAr de *L. chagasi* (U42465), *L. infantum* (GQ332359), *L. donovani* (GQ332356) , *L. guyanensis* (GQ332358), *L. amazonensis* (GQ332354) e *L. braziliensis* (GQ332355) com localização do iniciador *foward* espécie-específico *reverse* espécie-específico LCS3 (caixa com bordas verdes).....28

**FIGURA 8 –** Resultado da eletroforese do par de iniciador LCL1/LCL3 após a otimização do protocolo de PCR (30 ciclos, 60° C) . 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção; 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....31

**FIGURA 9-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCL1/LCL4 após mudança do protocolo padrão visando a otimização da reação, 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de *L. chagasi*, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....32

**FIGURA 10-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS1/LCS3 após a redução do número de ciclos de 40 para 30. 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de *L. amazonensis*; 4- DNA de *L. braziliensis*; 5- DNA de *L. guyanensis*; 6- controle negativo.....33

**FIGURA 11-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS2/LCS3 após a otimização do protocolo padrão, 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de *L. chagasi*, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....34

**FIGURA 12-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador 13A/13B, 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....35

**FIGURA 13-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador Lm5/Lm3G, 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....36

**FIGURA 14-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador MC1/MC2, 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....37

**FIGURA 15-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador descritos por PIARROUX (1994), 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....38

**FIGURA 16-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador descritos por PIARROUX (1995). 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....39

**FIGURA 17-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador descritos por SMYTH (1992) 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....40

**FIGURA 18-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador descritos por SALOTRA (2001) 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*;

3- DNA de cão livre de infecção, 4- DNA de *L. amazonensis*; 5- DNA de *L. braziliensis*; 6- DNA de *L. guyanensis*; 7- controle negativo.....41

**FIGURA 19-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS2/LCS3. 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de *L. amazonensis*; 4- DNA de *L. braziliensis*; 5- DNA de *L. guyanensis*; 6- DNA de *T. cruzi*; 7- DNA de *Toxoplasma gondii*; 8- DNA de *Ehrlichia canis*; 9- DNA de *Babesia canis*; 10- Controle negativo.....42

**FIGURA 20-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS1/LCS3. 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi*; 3- DNA de *L. amazonensis*; 4- DNA de *L. braziliensis*; 5- DNA de *L. guyanensis*; 6- DNA de *T. cruzi*; 7- DNA de *Toxoplasma gondii*; 8- DNA de *Ehrlichia canis*; 9- DNA de *Babesia canis*; 10- Controle negativo.....43

**FIGURA 21-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS2/LCS3. 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi* com diluição de 10 ng/ $\mu$ L; 3- DNA de *L. chagasi*: 1 ng/ $\mu$ L; 4- DNA de *L. chagasi*: 0,1 ng/ $\mu$ L; 5- DNA de *L. chagasi*: 0,01 ng/ $\mu$ L; 6- DNA de *L. chagasi*: 1 pg/ $\mu$ L; 7- DNA de *L. chagasi*: 0,1 pg/ $\mu$ L; 8-; DNA de *L. chagasi*: 10 fg/ $\mu$ L; 9- DNA de *L. chagasi*: 1 fg/ $\mu$ L; 10- DNA de *L. chagasi*: 0,1 fg/ $\mu$ L; 11- Controle negativo.....45

**FIGURA 22-** Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de iniciador LCS1/LCS3. 1- marcador de 100 pb; 2- DNA de *L. chagasi* com diluição de 10 ng/ $\mu$ L; 3- DNA de *L. chagasi*: 1 ng/ $\mu$ L; 4- DNA de *L. chagasi*: 0,1 ng/ $\mu$ L; 5- DNA de *L. chagasi*: 0,01 ng/ $\mu$ L; 6- DNA de *L. chagasi*: 1 pg/ $\mu$ L; 7- DNA de *L. chagasi*: 0,1 pg/ $\mu$ L; 8-; DNA de *L. chagasi*: 10 fg/ $\mu$ L; 9- DNA de *L. chagasi*: 1 fg/ $\mu$ L; 10- DNA de *L. chagasi*: 0,1 fg/ $\mu$ L; 11- Controle negativo.....46

## LISTAS DE QUADROS

**QUADRO 1-** Sequências de *iniciadores* avaliados para o diagnóstico de *L. chagasi* por PCR e respectivos genes alvo.....24

**QUADRO 2-** Sequências de oligonucleotídeos (*iniciadores*) selecionados para a amplificação específica de fragmentos dos genes 18S rRNA e LSU RNAr de *Leishmania chagasi* por PCR.....29

**QUADRO 3-** *Iniciadores* avaliados no projeto, gene alvo, fragmento esperado e presença ou ausência de reações inespecíficas.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G	Guanina
H	Horas
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LDDP	Laboratório de Diagnóstico de doenças parasitárias
LV	Leishmaniose visceral
MgCL <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
DNA <sub>r</sub>	Genes que codificam DNA <sub>r</sub>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA <sub>r</sub>	RNA ribossômico
T	Timina
T <sub>a</sub>	Temperatura de anelamento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultra violeta
WHO	WORLD HEALTH ORGANIZATION

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de grande importância em saúde pública, compreendendo zoonoses causadas por membros do gênero *Leishmania*, sendo de ocorrência em diversas regiões do mundo. Vários métodos já são utilizados para o diagnóstico dessas enfermidades, entre eles o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o exame direto ao microscópio. Como nenhuma destas técnicas permite um diagnóstico sensível e rápido, métodos de diagnóstico molecular baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram desenvolvidos. Recentemente, vários grupos têm mostrado que a PCR é um método sensível e específico para a detecção do DNA da *Leishmania* em uma variedade de amostras de humanos, cães e outros animais. Os protocolos desenvolvidos até o presente para o diagnóstico deste parasito por PCR, apesar de serem eficazes na identificação do DNA genômico alvo, promovem algumas amplificações inespecíficas ou não são conclusivos na distinção de *L. chagasi* de outras espécies do gênero. O objetivo deste trabalho foi a construção de iniciadores espécie-específicos para a detecção de *L. chagasi*, assim como a avaliação de protocolos descritos por outros autores, visando o diagnóstico da LV. Os iniciadores foram selecionados a partir do alinhamento das seqüências do gene 18S rRNA e também do LSU rRNA. Foram selecionados seis novos pares de iniciadores espécie-específicos para *L. chagasi*. Além desses novos pares, foram avaliados outros sete pares de iniciadores descritos na literatura. Os resultados permitiram concluir que os novos pares de iniciadores LCS1/LCS3 e LCS2/LCS3 foram eficientes para a amplificação espécie-específica de fragmentos de DNA de *L. chagasi* de 259 pb e 820 pb, respectivamente. Já os dois novos ensaios de PCR otimizados neste estudo, empregando os pares de iniciadores LCS1/LCS3 e LCS2/LCS3, foram efetivos para a detecção espécie-específica de até 1 pg/ $\mu$ L de DNA de *L. chagasi*. Os pares de iniciadores MC1/MC2 descritos por CORTES *et al.* (2004) assim como o par de iniciadores publicado por PIARROUX *et al.*, (1994) foram efetivos para a discriminação espécie-específica de *L. chagasi*. Os outros pares de iniciadores avaliados não apresentaram resultados satisfatórios quanto a especificidade para *L. chagasi*.

Palavras-chave: cães, diagnóstico, leishmaniose, pcr, iniciadores.

## ABSTRACT

The visceral leishmaniasis (LV) is a very important disease in public health, including zoonosis caused by members of *Leishmania* gender, occurring in many regions of the world. Several methods are being used to diagnose these diseases; among these methods are the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), indirect immunofluorescence reaction (RIFI) and direct examination by microscope. As none of these techniques allows a fast and sensitive diagnostic, methods of molecular diagnosis based on polymerase chain reaction (PCR) were developed. Recently, many groups have shown that PCR is a sensitive and specific method to *Leshmania* DNA detection in a variety of samples of humans, dogs and other animals. The protocols developed until these days to the parasite diagnose by PCR, although they be effective in the identification of the genomic DNA target, promote some inespecific amplifications or are inconclusive in the distinction of *L.chagasi* from other species of the gender. This work's objective was the construction of species-specific iniciadores to detection of *L.chagasi*, and evaluation of protocols described by other authors, aiming LV diagnosis. The primers were selected from the alignment of 18S rRNA gene sequences and also of the LSU rRNA. Were selected six new pairs of species-specific primers for *L. chagasi*. Besides these new pairs were assessed seven other pairs of primers described in the literature. The results showed that the new primer pairs LCS2/LCS3 LCS1/LCS3 were efficient for the species-specific amplification of DNA fragments of *L. chagasi* of 259 bp and 820 bp, respectively. In the other hand the two new PCR assays optimized in this study using the primer pairs and LCS1/LCS3 LCS2/LCS3 were effective for species-specific detection of up to 1 pg / mL of DNA from *L. chagasi*. The pairs of primers MC1/MC2 as well as the pair of primers PIA-94 were effective for the discrimination of species-specific *L. chagasi*. Other pairs of primers evaluated didn't showed a satisfactory results regarding the specificity for *L. chagasi*.

*Keywords: diagnosis, dogs, leishmaniasis, pcr, primers.*

## 1 . INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família *Trypanosomatidae*. Apresentam - se sob duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. São doenças distribuídas por todos os continentes e segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas; 350 milhões vivem em áreas de risco e aproximadamente 2 milhões de casos são registrados a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2009).

A leishmaniose tegumentar trata-se de uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele, de forma localizada ou difusa, dependendo da espécie. É causada por várias espécies de *Leishmania*, sendo as mais importantes: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*, responsáveis por manifestações cutâneas, mucosas, disseminadas, e ainda pela forma difusa da doença (BRASIL, 2006).

A leishmaniose visceral (LV) pode ser considerada a forma mais grave da doença, estando associada à elevada mortalidade, quando não tratada. Esta forma acomete cerca de 500.000 novos indivíduos a cada ano (WHO, 2009), sendo responsável por cerca de 59.000 óbitos anuais. Alguns autores acreditam que o número de óbitos anuais devido à LV é subestimado, uma vez, que a doença é de notificação compulsória apenas em 32 dos 88 países em que ocorre (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose visceral é uma zoonose causada por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* que infectam canídeos e algumas outras espécies de animais, tendo uma larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. A doença já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores . Os cães, considerados os principais reservatórios; domésticos, são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (BANETH, 2006).

A LV é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (WHO, 2009) .

Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (BRASIL, 2009).

No Brasil, a LV tem sido registrada como sendo resultante da infecção pela *Leishmania (L.) chagasi* estando envolvido os vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomia cruzi* (MARCONDES, 2009). No passado a LV era descrita como uma doença de ambientes silvestres ou rurais, entretanto, as transformações ambientais provocadas pelo intenso processo migratório e o processo de urbanização crescente levaram a uma expansão das áreas endêmicas, com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente .

Os programas de vigilância e controle da LV baseiam-se em ações que atuam no inseto vetor, no reservatório doméstico e no diagnóstico e tratamento de casos humanos. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial constitui uma ferramenta importante para que seja realizado o tratamento precoce dos casos humanos diagnosticados e a eliminação dos cães sororeagentes (BRASIL, 2006).

A confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste mais específico para a confirmação da doença. Porém, a sensibilidade deste método depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BANETH, 2006).

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. circulantes utilizando técnicas sorológicas constitui-se no instrumento mais utilizado para o diagnóstico da LV. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão

soroconversão e cães soropositivos que se convertem em soronegativos mas ainda permanecem infectados. Existem, na literatura, inúmeros relatos da ocorrência de reação sorológica cruzada entre os membros da família *Trypanosomatidae*, envolvendo, principalmente, os protozoários *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, os quais possuem uma relação filogenética muito estreita (GREENE, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que o diagnóstico da LV seja realizado por meio das provas sorológicas, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) (WHO, 2009). Porém, a literatura aponta para a ausência de um teste ideal para o diagnóstico da infecção por *L. chagasi* (MARCONDES, 2009).

Diante das limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, existe a necessidade de se desenvolver ferramentas que sejam capazes de promover um diagnóstico preciso, de forma rápida e segura. Assim, cada vez mais, os métodos moleculares vem sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, como também nos vetores envolvidos (SALAM *et al.*, 2010).

Dentre essas técnicas, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), que a partir de 1998 passou a ser usada com mais frequência para a identificação dos reservatórios de *Leishmania* (CORTES *et al.*, 2004). A PCR apresenta propriedades que mais se aproximam do ideal, pois com o uso de *iniciadores* apropriados a sensibilidade e a especificidade da técnica pode se aproximar de 100% (LACHAUD *et al.*, 2001).

A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens significativas, da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (RODGERS *et al.*, 1990).

Há diversos protocolos de PCR descritos na literatura para a detecção de *L. chagasi*, assim como inúmeros *iniciadores* testados, porém não há consenso entre um protocolo ideal para a detecção de *L. chagasi* e quais seriam os *iniciadores* mais indicados para a utilização (RODGERS *et al.*, 1990,

PIARROUX *et al.*, 1994, SALOTRA *et al.*, 2001, CORTES *et al.*, 2004, AOUN *et al.*, 2009).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar diversos protocolos de PCR descritos na literatura, construir e avaliar novos *iniciadores* espécie-específicos assim como otimizar novos protocolos para a detecção de *L. chagasi* por PCR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A primeira descrição dos parasitas que causavam a LV foi feita na Índia por Cunningham em 1885, em indivíduos acometidos pela doença. Em 1903 o agente etiológico foi descrito quase simultaneamente por William Leishman e Charles Donovan. Nesse mesmo ano, Ross denominou o parasita causador da LV de *Leishmania donovani*, criando então o gênero *Leishmania* (NEVES *et al.*, 1997).

O registro do primeiro caso da doença adquirida no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu um caso em material oriundo de necrópsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (ALENCAR *et al.*, 1991). Henrique Penna em 1934, a partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, verificou 41 casos positivos para *Leishmania*, identificados por histologia em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (MARCONDES, 2009).

Em 1936, Evandro Chagas e seus colaboradores realizaram extensos estudos que foram capazes de demonstrar a doença no homem e em cães, além de definir como provável vetor *Lutzomia longipalpis*. O parasita causador da LV no Brasil foi classificado então como *Leishmania chagasi* (NEVES *et al.*, 1997). Em 1956, Leônidas e Maria Deane desenvolveram estudos no Ceará que foram capazes de elucidar os aspectos epidemiológicos da doença, incluindo vetores, reservatórios e distribuição geográfica (MARCONDES *et al.*, 2009).

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente, está distribuída em 21 Unidades Federadas e nos últimos

anos foi registrada uma média anual de 3.357 casos humanos e 236 óbitos (BRASIL, 2009a).

## 2.2 Etiologia

O agente etiológico da LV é um protozoário pertencente ao filo Sarcocystophora, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (BADARÓ & DUARTE, 2002).

As espécies causadoras das leishmanioses na América Latina são divididas em dois grupos taxonômicos. Um é o subgênero *Viannia*, que compreende principalmente as espécies *L.(V)braziliensis*, *L.(V)panamensis* e *L.(V)guyanensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas ou mucocutâneas. O outro é o subgênero *Leishmania*, que compreende as espécies *L.(L)mexicana* e *L.(L)amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localizadas ou difusas, e *L.chagasi*, causadora da LV (TAYLOR, 2010).

A espécie envolvida com a infecção na LV difere de acordo com a região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania chagasi* nas Américas (BRASIL, 2006).

Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e *L. infantum* sejam a mesma espécie, o que motivou alguns autores a denominarem de *L. infantum* o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURÍCIO *et al.*, 1999). Dessa forma, o termo *L. chagasi* e *L. infantum* são usados como sinônimos.

As leishmanias são protozoários pleomórficos que completam seus ciclos de vida em dois hospedeiros, sendo um vertebrado (canídeos, roedores ou humanos) e um invertebrado (KONTO;KOUTINAS, 1993). Apresentam duas formas; uma aflagelada ou amastigota, intracelular obrigatória, encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados e, outra, flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório dos insetos vetores (BANETH, 2006).

### 2.3 Reservatórios e vetores

A doença já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores (BANETH, 2006). Os cães, considerados os principais reservatórios domésticos, são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral. Essa importância baseia-se no fato da LV ser mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e, pelo fato dos cães apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele do que o homem, o que favorece a infecção dos vetores (TAYLOR *et al.*, 2010).

No ambiente silvestre, os reservatórios são os canídeos silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (DEANE, 1956; LAINSON *et al.*, 1990; BRASIL, 2006).

No passado a LV era descrita como uma doença de ambientes silvestres ou rurais, entretanto, as transformações ambientais provocadas pelo intenso processo migratório e o processo de urbanização crescente levaram a uma expansão das áreas endêmicas, com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente (BRASIL, 2006).

Os vetores da LV são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006; MARCONDES, 2009).

### 2.4 Patogenia e sinais clínicos

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado o flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp., as quais sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas. Estas colonizam o tubo digestório do vetor e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, as quais diferenciam-se em formas amastigotas no interior de macrófagos. Ocorre então a disseminação linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção dissemina-se para linfonodos, baço e medula óssea dentro das primeiras horas (KONTOS & KOUTINAS, 1993; BANETH, 2006).

O quadro clínico dos cães infectados varia do aparente estado sadio a um severo estágio final, sendo os animais classificados, de acordo com os sinais clínicos apresentados, em assintomáticos – ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção, oligossintomáticos – presença de adenopatia linfóide, pêlo opaco e pequena perda de peso e sintomáticos – todos ou alguns sinais mais comuns da doença (BRASIL, 2006). Nos animais sintomáticos, as principais manifestações clínicas incluem emaciação lenta e progressiva; alopecia local ou generalizada, sem prurido; lesões crostosas e ulcerativas, em geral no espelho nasal, orelhas e extremidades; descamação furfurácea; conjuntivite; febre irregular; apatia; tosse; linfadenomegalia; hepatoesplenomegalia e onicogrifose (FEITOSA *et al.*, 2000; BRASIL, 2006).

## **2.5 Medidas de controle e prevenção da leishmaniose visceral**

O cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV. Porém, a correlação entre casos de leishmaniose visceral humana (LVH) e leishmaniose visceral canina (LVC) ainda é motivo de controvérsias. Alguns autores não encontraram uma correlação direta entre a incidência da LVH e LVC em áreas endêmicas (COURTENAY *et al.*, 2002; RIBEIRO, 2007). Por outro lado,

foi observado que a ocorrência de surtos caninos tem precedido a ocorrência de casos humanos, além de constatação de que a infecção em cães tem sido mais prevalente (ALENCAR *et al.*, 1987; ANTONIALLI *et al.*, 2007). Portanto, há necessidade de mais estudos relacionados ao papel dos cães na manutenção da transmissão da LVH. Por estes motivos, uma das medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV é a eliminação dos cães soropositivos. Outras medidas são baseadas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, na redução da densidade populacional do vetor, no uso de coleiras em cães com inseticidas e atividades de educação em saúde.

O tratamento utilizado com eficácia em humanos acometidos pela LV não é recomendado para cães, pois além de induzir uma aparente remissão dos sinais clínicos, não previne recidiva e parece ter efeito limitado na infectividade de vetores, podendo levar o risco de selecionar parasitas resistentes em relação às drogas utilizadas no tratamento de humanos (BRASIL, 2006). Por isso o tratamento canino no Brasil é proibido devido ao risco que esta conduta acarreta para a saúde humana (BRASIL, 2009b).

## **2.6 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina**

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença. Os achados clínicos não são patognomônicos e podem sugerir outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial necessário para a confirmação da suspeita (FEITOSA *et al.*, 2000).

A confirmação do diagnóstico da LV pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (BANETH, 2006).

### **2.6.1 Diagnóstico parasitológico**

O diagnóstico parasitológico é o método considerado de alta especificidade e se baseia na demonstração do parasito obtido de amostra clínica

do animal suspeito. Porém, alguns desses procedimentos são métodos invasivos, o que significa a ocorrência de riscos para o animal e também são impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais devem ser avaliados em curto espaço de tempo (BRASIL, 2006).

Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença (DYE *et al.*, 1993; LEONTIDES *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2004). Podem ser observadas formas amastigotas do parasita em esfregaços de aspirado de linfonodos, medula óssea, *imprint* de pele, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sangüíneos corados com corantes de rotina, tais como *Giemsa*, *Wright* e Panótico.

As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma esférica a ovóide, medindo 2-5  $\mu\text{m}$  e contendo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (SWENSON *et al.*, 1988). A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo dedicado à leitura da lâmina (WOLSCHRIJN *et al.*, 1996). Na dependência do tempo dispendido procurando o parasita, a sensibilidade passa a ser de, no máximo, 80% em cães sintomáticos e menor em cães assintomáticos. Em alguns casos a visualização de parasitas é muito laboriosa e os resultados falso negativos não são incomuns (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006).

### **2.6.2 Diagnóstico sorológico**

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. circulantes utilizando técnicas sorológicas constitui-se no instrumento mais utilizado para o diagnóstico da LVC. Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* spp. A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente antes da soroconversão, cães

que nunca farão soroconversão e cães soropositivos que se convertem em soronegativos mas ainda permanecem infectados (FERRER, 2002; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006). Animais com menos de três meses de idade não devem ser avaliados através de métodos sorológicos pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (BRAGA *et al.*, 1998).

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino são a RIFI e o ELISA. As alterações dos valores do ponto de corte podem, conseqüentemente, alterar a sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos (FERRER, 1995).

A RIFI tem sido a técnica sorológica mais utilizada no diagnóstico da LV, particularmente em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2006), entretanto, possui a desvantagem de que, quando da análise de um grande número de amostras, o tempo dispendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande (RACHAMIN *et al.*, 1991). Existem, na literatura, inúmeros relatos da ocorrência de reação sorológica cruzada entre os membros da família *Trypanosomatidae*, envolvendo, principalmente, os protozoários *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma. cruzi*, os quais possuem uma relação filogenética muito estreita. Antígenos de superfície e antígenos dos microtúbulos do citoesqueleto do protozoário são comuns a todos os tripanosomatídeos o que justificaria a ocorrência de reação cruzada entre eles (BADARÓ *et al.*, 1986). No entanto, a ocorrência de reação cruzada entre leishmaniose visceral canina e outros agentes etiológicos por meio dos métodos sorológicos ainda é motivo de discordâncias na medicina veterinária (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER *et al.*, 2005).

O teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. apresenta, dependendo do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 95% e 99,5% e uma especificidade entre 97,1% a 100% (LAURENTI *et al.*, 2005). Há, contudo, discordâncias entre alguns autores, os quais descreveram valores de sensibilidade e especificidade de 80 e 81%, respectivamente (ASHFORD *et al.*, 1995) e outros que observaram valores de 100% para ambos os índices (VERCAMMEN *et al.*, 1997). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do

parasita) e de mudanças no protocolo experimental padrão (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas) (REITHINGER *et al.*, 2000). As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, mas também com organismos filogeneticamente distantes (RACHAMIN *et al.*, 1991; MELO, 2004).

Enquanto alguns trabalhos apontam para a ocorrência de reação cruzada entre LVC e babesiose canina ou doença de Chagas por meio da técnica de ELISA (ROSÁRIO *et al.*, 2005), outros afirmam não existir reação cruzada com erliquiose e babesiose (LIMA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008), toxoplasmose (LIMA *et al.*, 2005) e doença de Chagas (VERCAMMEN *et al.* 1997).

Os métodos sorológicos apresentam algumas desvantagens como a dificuldade em diferenciar uma infecção parasitária atual de uma anterior. Também não conseguem correlacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença. O custo da produção de antígenos específicos purificados é geralmente muito alto e conseqüentemente preparações com antígenos brutos são frequentemente utilizadas, reduzindo a especificidade e sensibilidade (GREENE, 2006).

### **2.6.3 Diagnóstico molecular**

Os métodos de diagnóstico através de técnicas de biologia molecular também estão sendo utilizados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania chagasi* (TELLEIRA *et al.*, 1999, BRANDÃO FILHO *et al.*, 2003, CORTES *et al.*, 2004, GOMES, 2007; PILLATI *et al.*, 2009; SALAM *et al.*, 2010). Por volta de 1998 a PCR passou a ser usada com mais freqüência para a identificação dos reservatórios de *Leishmania* (TELLEIRA *et al.*, 1999; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

A PCR é o método que permite a amplificação de regiões específicas do DNA com o uso de uma enzima termoestável, a *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Com essa enzima

uma sequência alvo do DNA pode ser amplificada em até um milhão de vezes após sucessivos ciclos, sendo que estes consistem de três passos. No primeiro passo o DNA é desnaturado, produzindo duas fitas simples de DNA. No segundo passo ocorre o anelamento, onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam as sequências complementares do DNA alvo. O terceiro passo consiste na extensão das novas fitas formadas, é neste passo que a enzima adiciona as novas fitas os desoxinucleotídeos trifosfatos presentes na solução. Cada um destes passos ocorre em temperaturas bem definidas, a desnaturação ocorre a 94° C, a extensão ocorre a 72° C e a temperatura de anelamento vai depender do comprimento e do conteúdo dos oligonucleotídeos usados na PCR. Antes de fazer a reação é necessário obter o DNA do parasita, o que é realizado através de método de extração, que pode ser conduzido utilizando-se substâncias químicas ou simplesmente através da fervura (PERSING, 1993).

Uma das etapas fundamentais da técnica de PCR é o desenvolvimento de um par de iniciadores adequado para a região que se pretende amplificar. O desenvolvimento de iniciadores requer o conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos, ou pelo menos das extremidades do gene ou do segmento de DNA a ser amplificado. Este pré-requisito vem se tornando menos restritivo com o desenvolvimento de métodos automatizados de seqüenciamento e com o crescente desenvolvimento de programas de seqüenciamento do genoma de diversas espécies. Em virtude da conservação evolutiva dos genomas, quando a informação não é disponível para a espécie foco do trabalho, é possível utilizar informações de espécies relacionadas, optando-se pelo desenvolvimento de iniciadores para as seqüências de nucleotídeos mais conservadas entre duas ou mais espécies (COUTINHO e REGITANO, 2001).

Existem diferentes alvos de amplificação no genoma de *Leishmania* que já foram descritos para diagnóstico. Esses são normalmente seqüências repetitivas e/ou polimórficas. Como exemplos, tem-se os genes para o RNA ribossomal e seus espaçadores,  $\beta$ -tubulina, locus gp63, hsp70, cisteino proteinases e minicírculos do DNA de cinetoplasto (kDNA) (REITHINGER *et al.*, 2000;; SINGH, 2006). Este último tem sido considerado um dos melhores alvos

para PCR sendo que podem ser amplificados os minicírculos completos ou somente suas regiões conservadas (GONTIJO; MELO, 2004). Na era pós genômica, vem ocorrendo a identificação e a caracterização de um número cada vez maior de seqüências nucleotídicas potenciais de *Leishmania* para novos alvos de PCR.

Devido à elevada sensibilidade a técnica de PCR se torna muito adequada para procedimentos de diagnóstico. A sensibilidade e a especificidade da PCR estão diretamente ligadas ao conjunto de iniciadores utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (ALVAR *et al.*, 1994; CORTES *et al.*, 2004; SALAM *et al.*, 2010).

A PCR tem sido amplamente utilizada na detecção do DNA do parasito em vários materiais biológicos como sangue, medula óssea, pele, amostra conjuntival e líquido (FERRER, 1999; LACHAUD *et al.*, 2002; AOUN *et al.*, 2009). Pode ainda ser utilizada em amostras de tecidos que foram submetidos à avaliação histopatológica ou à técnica de imunohistoquímica e onde não foi possível a identificação do parasita. As amostras de tecidos fixadas em formol e incluídas em parafina são um importante recurso para estudos moleculares, embora a rotina histopatológica possa causar a degradação do DNA nos tecidos (COOMBS, 1999).

Além da possibilidade de utilizar várias amostras clínicas a PCR apresenta como outras vantagens a habilidade de trabalhar com pequenas quantidades de material a ser analisado e ser capaz de detectar níveis baixos de parasitas nas amostras (MELO, 2004).

Uma forma de aumentar a sensibilidade da PCR é o uso de alvos multicópias, como minicírculos do cinetoplasto (SMYTH *et al.*, 1992). Utilizando os conhecimentos já obtidos referentes às seqüências de nucleotídeos do DNA genômico do parasita, diferentes pares de oligonucleotídeos vêm sendo propostos e testados para o diagnóstico da LV por meio da PCR com resultados promissores. Estes estudos mostraram que a técnica da PCR é sensível para o

diagnóstico de pacientes infectados com *L. donovani* ou *L. chagasi* (GOMES *et al.*, 2007).

Uma variedade de protocolos para detectar *L. infantum* tem sido desenvolvidos, e a técnica da PCR tem mostrado ser uma técnica sensível e altamente específica para a detecção de infecções assintomáticas ou não provadas parasitologicamente (ASHFORD *et al.*, 1995; QUINNELL *et al.*, 2001; AOUN *et al.*, 2009).

O diagnóstico por PCR independe do *status* imunológico do animal e pode ser utilizado em caso de anergia ou de reações cruzadas em testes sorológicos convencionais. Além disso, a técnica pode ser utilizada em estudos epidemiológicos para auxiliar na determinação da prevalência em áreas onde a doença não está controlada. A PCR é capaz de detectar mais de 30% de infecções por *Leishmania* spp. em cães soronegativos (MILES *et al.*, 1999) e é mais eficiente para detectar estágios iniciais da doença, enquanto que as técnicas sorológicas são mais eficazes para diagnosticar estágios avançados da infecção, embora muitos casos positivos possam se converter em soronegativos durante o curso da infecção (GRADONI, 2002). Estudos utilizando a PCR em cães de áreas endêmicas demonstraram prevalências maiores do que as obtidas em testes sorológicos clássicos (SOLANO -GALLEGO *et al.*, 2001).

Diante do exposto a PCR parece ser a técnica que mais se aproxima do ideal, pois com o uso de *iniciadores* apropriados a sensibilidade e a especificidade da técnica pode se aproximar de 100% (REED 1996, MARQUES *et al.*, 2001, CORTES *et al.*, 2004).

ASHFORD *et al.* (1995) demonstraram, em estudo realizado na América do Sul, que a PCR apresentou maior sensibilidade que a sorologia e a cultura de parasitas para o diagnóstico da LVC. Esses autores indicam que a PCR pode tornar-se o principal método de diagnóstico na identificação de cães portadores de LVC.

Tem-se demonstrado a ocorrência de cães PCR positivos soronegativos (REALE, *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO, *et al.*, 2001). RODRIGUES *et al.* (2002) demonstraram maior sensibilidade da PCR para detecção de *Leishmania* spp. em relação aos testes convencionais. CORTES *et*

*al.* (2004) mostraram que a PCR é dotado de alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma do DNA de uma *Leishmania*, o equivalente a 1/10 do parasita e tem sido um dos testes mais empregados para busca de reservatórios de leishmaniose (OLIVEIRA *et al.* 2005).

MULLER *et al.* (2003) avaliaram 18 amostras de tecido cutâneo fixadas em formol e incluídas em parafina, e que já haviam sido submetidas à avaliação histopatológica e imunoistoquímica. Esses autores concluíram que a PCR é uma boa técnica para complementar o diagnóstico da LV, mas indicam ser indispensável verificar a ocorrência de degradação das amostras por meio da utilização de oligonucleotídeos iniciadores da espécie estudada.

SCHONIAN *et al.*, (2003) avaliaram a sensibilidade e especificidade de dois métodos de PCR, sendo que um amplifica a região variável do gene SSU rRNA e o outro a ITS1. Foram analisadas amostras de sangue, aspirados de medula óssea, biópsia de pele e esfregaço de pele sobre papel filtro ou sobre lâminas de vidro. Foram utilizadas amostras de cães e humanos. Também foi realizada uma diluição seriada de cultura de promastigotas de *L. donovani* ou *L. infantum*. O método SSU rRNA – PCR foi mais sensível do que o ITS1-PCR.

SOLANO-GALLEGO *et al.*, (2004) estudando a pele clinicamente sem alterações, correspondente à região do plano nasal de cães sintomáticos e assintomáticos, pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR, observaram parasitas no tecido cutâneo de 70% dos cães sintomáticos, mas não observaram parasitas pela imunoistoquímica na pele dos cães assintomáticos. Já a PCR mostrou positividade de 100% em todos os cães sintomáticos e assintomáticos.

MOREIRA *et al.*, (2007) compararam a eficácia de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares em diagnosticar cães com diferentes sinais clínicos. A PCR apresentou sensibilidade de 95% a 100%, mostrando ser a mais sensível das técnicas utilizadas e indicando ser um método muito eficiente para o diagnóstico da LVC.

A principal desvantagem das técnicas de biologia molecular é que são requeridos laboratórios bem equipados e habilidade técnica (BRASIL, 2006). Apesar do custo ainda ser elevado para realização da PCR, observa-se que há

uma tendência de aumento de demanda e, com isso, é possível que ocorra redução de custos e a técnica torne-se mais acessível.

Embora muitas pesquisas estejam direcionadas a encontrar um protocolo padrão para o diagnóstico da LV, poucos estudos foram realizados com o intuito de comparar os métodos já disponíveis na literatura. Existem diversos *iniciadores* descritos, assim como variações entre os diversos protocolos de PCR utilizados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar diversos protocolos de PCR descritos na literatura e avaliar novos *iniciadores* espécie-específicos assim como otimizar novos protocolos para a detecção de *L. chagasi* por PCR.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho teve como objetivos gerais a avaliação de iniciadores e a otimização de novos protocolos de ensaios de PCR para o diagnóstico específico de *Leishmania chagasi*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Selecionar novos iniciadores para serem utilizados como iniciadores na amplificação espécie-específica por PCR a partir de sequências dos genes 18S RNAr e LSU RNAr, incluindo o primeiro e o segundo espaços transcritos (ITS1 e ITS2) de *Leishmania chagasi*;
- Otimizar e validar novos protocolos de PCR para a detecção específica de *L. chagasi*;
- Avaliar a especificidade analítica de diferentes iniciadores e protocolos de PCR específicos para *L. chagasi* descritos na literatura;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local e período de realização

O projeto foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias (L.D.D.P.) do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG), durante o período de janeiro a dezembro de 2009.

### 4.2 Obtenção de amostras de DNA referência

Para a realização dos ensaios de PCR foram utilizadas amostras de DNA genômico de *Canis familiaris* e dos seguintes microrganismos: *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*.

As amostras de DNA genômico de *Canis familiares*, *B. canis* e *E. canis* utilizado para as avaliações de especificidade foram procedentes do LDDP/EV/UFG. As amostras de DNA genômico de *L. chagasi* utilizadas foram provenientes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (UNESP) e do LDDP/EV/UFG. As amostras de DNA genômico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (cepa PH8), *L. guyanensis* (PLR6), *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e *Toxoplasma gondii* (cepa RH tipo I) utilizados neste estudo foram cedidas pelo Banco Imunobiológico das Leishmanioses da região Centro-Oeste do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do IPTSP da UFG.

### 4.3 Construção de iniciadores

A seleção de novos oligonucleotídeos foi realizada a partir de sequências de referência para os genes 18S RNAr e LSU RNAr das diferentes espécies do gênero *Leishmania*, obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dessa forma, para o gene 18S RNAr foram utilizadas as sequências para as seguintes espécies e seus correspondentes números de acesso no GenBank: *L. chagasi* (acesso GenBank U42465), *L. infantum* (GQ332359), *L. donovani* (GQ332356), *L. guyanensis* (GQ332358), *L. amazonensis* (GQ332354), *L. braziliensis* (GQ332355).

Para os genes LSU RNAr foram utilizadas as seguintes sequências com seus respectivos números de acesso: *L. chagasi* (AJ000306), *L. lainsoni* (DQ182542), *L. naiffi* (DQ182543), *L. amazonensis* (FJ753373), *L. braziliensis* (FJ753385), *L. guyanensis* (FJ753390).

As sequências foram identificadas, copiadas em arquivo digital, editadas no modelo *fasta* e submetidas ao alinhamento pelo método de múltipla progressão de Clustal W (THOMPSON et al., 1994), através do *software* Megalin (LaserGene, DNASTar, Inc.).

Os iniciadores *L. chagasi*-específicos foram então selecionados de regiões não conservadas ou semi-conservadas do gene. Para a definição das sequências dos oligonucleotídeos seguiram-se recomendações técnicas específicas (LISBY, 1999; UNIVERSITY OF NEBRASKA, 2008).

Após a seleção e antes da síntese, os iniciadores foram submetidos à avaliação de similaridade com as sequências do GenBank, utilizando-se o algoritmo BLAST-N<sup>®</sup> (*Basic Local Alignment Search Tool- Nucleotides*) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências que apresentaram percentual de identidade específico para *L. chagasi* foram encaminhadas para a síntese dos oligonucleotídeos.

Foram construídos iniciadores anti-senso (*reverse*) e iniciadores senso (*forward*) tanto do gene 18S rRNA quanto da região do LSU RNAr. Os oligonucleotídeos selecionados da região do gene 18S rRNA foram os seguintes: LCS-1 (*forward*), LCS-2 (*forward*) e LCS-3 (*reverse*). Já do LSU RNAr selecionou-

se os seguintes oligonucleotídeos: LCL-1 (*foward*), LCL-2 (*foward*), LCL-3 (*reverse*), e LCL-4 (*reverse*).

#### 4.4 Ensaios de PCR

A preparação do *mix* de reação de PCR e as condições de amplificação foram estabelecidas a partir de adaptações dos protocolos descritos por LINHARES et al. (2002) e otimizadas, segundo PERSING (1993). Dessa forma foi estabelecido o volume de 50 µL para o *mix* de reação, composto por 38,25 µL de água ultra-pura (*Dnase/Rnase-Free Distilled water - Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*PCR buffer 10X Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 50nM (*Invitrogen*); 1 µL de dNTP 1m mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µL (10pM) do iniciador *foward*, 0,5 µL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 2,5 µL do DNA genômico da amostra.

Foram utilizados as seguintes combinações de novos iniciadores visando a detecção específica de *Leishmania chagasi*: LCL-1/LCL-3; LCL-2/LCL-3; LCL-1/LCL-4; LCL-2/LCL-4; LCS-1/LCS-3 e LCS-2/LCS-3. Além desses iniciadores, também utilizou-se pares de iniciadores descritos por outros autores. A mistura para a reação de PCR foi então imediatamente submetida ao processo de amplificação por PCR, em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*), previamente programado , a um número de ciclos e temperaturas, conforme adaptado de LAUERMAN (1998): um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por dois minutos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94 °C por 30 segundos, 30 segundos na temperatura de anelamento calculada para cada par de iniciador a ser utilizado na reação e um minuto a 72 °C, finalizando a reação com uma fase de extensão adicional a 72 °C por dois minutos.

A temperatura de anelamento para os iniciadores foi calculada a partir da seguinte fórmula:  $T_a: [ 2 \text{ }^\circ\text{C} (A + T) + 4 \text{ }^\circ\text{C} (G + C)] - 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , onde: A = quantidade de bases adenina na sequência do iniciadores, T: quantidade de

bases timina, G: quantidade de bases guanina, C: quantidade de bases citosina (OGLIARI et al., 2000).

Cada ensaio de PCR utilizando os pares de iniciadores testados foram repetidos por pelo menos quatro vezes, tanto os testes referentes a sensibilidade quanto a especificidade.

#### **4.5 Controles para as reações de PCR**

Em todas as reações realizadas durante o presente trabalho foram incluídos controles positivo e negativo. Como controle positivo nas reações em que se avaliou novos iniciadores quanto a eficácia, especificidade e sensibilidade, foram utilizados DNA genômico procedentes de diferentes laboratórios e instituições, conforme descrito no item 4.2.

Como controle negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada, livre de dnases e rnases (*Dnase/Rnase-Free Distilled water - Invitrogen*).

#### **4.6 Otimização dos ensaios de PCR**

A partir do protocolo de amplificação definido como padrão, foram executadas reações de PCR como testes de otimização, visando avaliar diferentes números de ciclos de amplificação e diferentes temperaturas de anelamento, conforme PERSING (1993) e BRENT *et al.* (1994).

#### **4.7 Avaliação da especificidade analítica dos oligonucleotídeos**

As avaliações *in vitro* da especificidade para os novos iniciadores (LCL-1, LCL-2, LCL-3, LCL-4, LCS-1, LCS-2 e LCS-3) foram realizadas em ensaios de PCR com as amostras de DNA de referência descritas no item 4.5.

#### **4.8 Determinação e avaliação da sensibilidade analítica duas reações**

Para a realização dos testes de limiar de detecção utilizou-se DNA genômico de *L. chagasi* com a concentração inicial conhecida de 10 ng/μL. Para estabelecer o limiar de sensibilidade da reação de PCR, foram feitas diluições seriadas com as respectivas concentrações: 10ng/μL; 1ng/ μL; 0,1 ng/μL; 0,01 ng/μL; 1 pg/μL; 0,1 pg/μL; 10 fg/ μL; 1 fg/μL; 0,1 fg/μL.

#### **4.9 Avaliação de iniciadores e protocolos descritos por outros autores**

As reações de PCR para as avaliações referentes aos iniciadores descritos na literatura foram realizadas seguindo os protocolos publicados pelos autores. Foram feitas reações de PCR para cada par de iniciador, utilizando as amostras de DNA dos seguintes microrganismos: *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Em cada reação também foi incluído controle negativo.

Foram analisados um total de sete diferentes pares de iniciadores, cujos nomes, sequências e genes alvos constam no QUADRO 1.

Os fragmentos-alvo previstos para cada par de oligonucleotídeo foram, conforme os autores: 120 pb (13A/3B), 700 pb (Lm5/Lm3G), 600 pb (Ldl1/Ldl2), 100 pb (PIARROUX *et al.*, 1994), 260 pb (PIARROUX *et al.*, 1995), 809 pb (SMYTH *et al.*, 1992) e 447 pb (MC1/MC2).

**QUADRO 1-** Sequências de *iniciadores* avaliados para o diagnóstico de *L. chagasi* por PCR e respectivos genes alvo

<b>Autor/ iniciadores</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Gene alvo</b>
RODGERS <i>et al.</i> , 1990 13A e 13B	5'- GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' 5'- ATTTTACACCAACCCCCAGTT- 3'	mini-círculos do DNA do kinetoplasto
RAVEL <i>et al.</i> , 1995 Lm5 e Lm3G	5'-TGGTGTAATAATAGGCCAGGTGG-3' 5'- CCTACCCGCGGGACCAGAAAAG-3'	mini-círculos DNA de <i>L. infantum</i>
SALOTRA <i>et al.</i> , 2001 Ldl1 e Ldl2	5'- AAATCGGCTCCGAGGCGGGAAAC- 3' 5'-GGTACTACTATCAGTAGCAC -3'	mini-círculos do cinetoplasto de <i>L. donovani</i> .
PIARROUX <i>et al.</i> , 1994 -----	5'-ACG AGGTCAGCTCCACTCC-3' 5'-CTGCAACGCCTGTGTCTACG-3'	região conservada de <i>L. infantum</i>
PIARROUX <i>et al.</i> , 1995 -----	5'-CGGTCGCACCATGCGGTG-3' 5'- ACATCCCI'GCC-CACATACGC-3'	região conservada de <i>L. infantum</i>
SMYTH <i>et al.</i> , 1992 -----	5'- CCAGTTTCCCGCCCCG -3' 5'-GGGGTTGGTGTAATAATAGGGC-3'	mini-círculos do DNA do kinetoplasto
CORTES <i>et al.</i> , 2004 MC1 e MC2	5'- GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3' 5'- CACCCATTTTTCCGATTTTG-3'	mini-círculos do DNA do kinetoplasto de <i>L. infantum</i>

#### 4.10 Leitura das reações de PCR

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente aplicados em gel de agarose 1,2% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TBE1x.

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 025% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) foram aplicados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder* 100pb (*Invitrogen*). As eletroforeses foram conduzidas em cuba (*Horizon 11.14, Life Technologies*), a 90 V, durante 60 minutos.

Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL). A visualização foi feita pela utilização do aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*), em ambiente escuro.

#### **4.11 Documentação fotográfica**

A documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi realizada em equipamento fotodocumentador de géis (*Vilber Lourmat*) e armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (*PhotoCapt, Viber Lourmat*).

## REFERÊNCIAS

1. ALENCAR J.E. Estudos sobre a epidemiologia de calazar no estado de Ceará, Brasil. Calazar canino versus calazar humano: aspectos profiláticos e históricos. **Rev Soc Bras Med Trop.**; 20: 156-157. 1987.
2. ALENCAR, J.E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.
3. ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
4. ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J., VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRES, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUES, F. Canine leishmaniosis, clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. **Annals of the Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 371-378, 1994.
5. ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259- 265, 2004.
6. ANTONIALLI, S.A.C.; TORRES, T.G.; PARANHOS-FILHO, A.C.; TOLEZANO, J.E. Spatial analysis of american visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, central **Brazil**. **J Infect** ; 54: 509- 514. 2007.
7. AOUN O.; MARY, C.; ROQUEPLO, C.; MARIE, J.L. et al. 2009. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. **Veterinary Parasitology**, Vol. 166, n.1, p.27-31, 2009.
8. ASHFORD, D.A., BOZZA, M., Freire, M., MIRANDA, J.C. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** vol. 53, p. 251-255, 1995.
9. BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2002. v. 2, p. 1254-1279.
10. BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr., W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

11. BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases**. 3ed. Canada: Elsevier, 2006. p.686-689.
12. BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.315, n.5, p.419-424, 1998.
13. BRANDÃO-FILHO, SP; BRITO, MEF; CARVALHO, FG; ISHIKAWA, EA; CUPOLILLO, E; FLOETER-WINTER, LM; SHAW, JJ. Wild and synantropic hosts of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans. Rev. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, 97: 291-296. 2003.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.
15. BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2008**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS\\_CONF\\_2008LV.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2008LV.pdf). Acesso em: 20 nov. 2009a.
16. BRASIL. PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008. Disponível em ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)). Acesso em 12 de abril de 2009b.
17. BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; SEIDMAN, J.G.; STRUHL, K.; AUSUBEL, F.M.; CHANDA, V.B.; MOORE, D.D. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 1600 p.
18. COOMBS, N.J.; GOUGH, A.C.; PRIMROSE, J.N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 16, p.12, 1999.
19. 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 iniciadores. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, p. 12-17. 2004.
20. COUTINHO L.L., REGITANO L.C.A. Introdução à Análise de Marcadores Moleculares. In: Regitano L.C.A., Coutinho, L. L. (eds.) **Biologia Molecular**

- Aplicada à Produção Animal**. 1. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2001. p. 11-24.
21. COURTENAY O, QUINNELL RJ, GARCEZ LM, SHAW JJ, DYE C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**. ;186:1314-20. 2002.
  22. DEANE, L. M. *Leishmaniose visceral no Brasil*. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro. Serviço Nacional Educação Sanitária, 1956.
  23. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 27: 305- 318. 2004.
  24. DYE, C., WILLIAMS, B.G. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proc. Royal Soc. London**, v.254, p.33-39, 1993.
  25. FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.28, p.36-42, 2000.
  26. FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.136, p.514-516, 1995.
  27. FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: an up date. INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1, 1999, Barcelona, Spain. **Proceedings...** Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet. p.6-10. 1999.
  28. FERRER L. The pathology of canine leishmaniasis. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Seville, Spain, p.21-24. 2002.
  29. GOMES, A.H.; FERREIRA, I.M.; LIMA, M.L.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAÚJO, M.F. PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, n 3-4, p. 234-241, 2007.
  30. GONTIJO, C.M., MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.
  31. GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha.

- Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum.**  
Seville: [s.n.], p. 7-14. 2002.
32. GREENE, C. E.; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 3. Ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. 1387p.
33. IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, A.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n.62, p.32-38, 2006.
34. KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F.; Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.
35. LACHAUD, L., HAMMAMI, S.M., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J.P., BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 210-215. 2002.
36. LAISON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135 -137, Jan./Mar. 1990.
37. LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 152 p. 1998.
38. LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B. Evaluation of Kalazar Detect™ Rapid Test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy. p.160. 2005.
39. LEONTIDES, L.S., GALATOS, A.D., MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.** 109, 19-27. 2002.
40. LIMA, V.M.F. et al. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Vet. Bras.**, v. 25, p.215-218,. 2005.
41. LINHARES, G.F.C., SANTANA, A.P, LAUEMAN, L.H., MADRUGA, C.R. Assessment of iniciadores designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002.

42. LISBY, G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Molecular Biotechnology**, v.12, n.2, p.75-99, 1999.
43. MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.
44. MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. 557 p.
45. MARQUES, M.J., VOLPINI, A.C., GENARO, O., MAYRINK, W.; ROMANHA, A.J. Simple form clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg** 65: 902-906. 2001.
46. MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, 119, 237-246, 1999.
47. MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, sup. 1, p. 41-45, 2004.
48. METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5515-9, 2005.
49. MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: an update. **Hoechst Roussel Vet.** p. 46-53, 1999.
50. MOREIRA, M.A.B, LUVIZOTTO, M.C.R., GARCIA, J.F., CORBETT, C.E.P., LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n.3-4, p. 245–252, 2007.
51. MULLER, N., ZIMMERMANN, V., FORSTER, U., BIENZ, M., GOTTSTEIN, B., WELLE, M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffinembedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Vet. Parasitol.** 114, 223-229. 2003.

52. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 524 p
53. NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.; AZEVEDO, M.A.A.; LIMA, V.M.F. GARCIA, J.F.; Avaliação da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 16, 1, p. 5-9, 2007.
54. OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.395-398, 2000.
55. OLIVEIRA, J.G.S; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, C.I.; CRUZ JUNIOR, A.C.; CAMPOS, L.F.; ROCHA, A.V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Trop** 94: 55-59. 2005.
56. OLIVEIRA, T.M.F.S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, vol. 17, 1, p. 7-11. 2008.
57. PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, cap.4, 1993, p.88-104.
58. PIARROUX, R., F. GAMBARELLI, H. DUMON, M. FONTES, S. DUNAN, C. MARY, B. TOGA, AND M. QUILICI. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral *Leishmaniasis* in immunocompromised patients. **J. Clin. Microbiol.** 32:746–749. 1994.
59. PIARROUX, R., M. FONTES, R. PERRASSO, F. GAMBARELLI, C. JOBLET, H. DUMON, AND M. QUILICI. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. **Mol. Biochem. Parasitol.** 73:249–252. 1995.
60. PILATTI, M. M. ; FERREIRA, S. A. ; MELO, M. N. ; ANDRADE, A. S. R. . Comparison of PCR Methods for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Conjunctival Swab Samples. **Research in Veterinary Science**, vol.87, p. 255-257. 2009.
61. QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania*

- infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 253- 261, 2001.
62. RACHAMIM N, JAFFE CL, ABRANCHES P, et al. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Ann Trop Med Parasitol**. 85:p. 503–508. 1991.
63. RAVEL, S. et al. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v. 59, p. 187-196, 1995.
64. REALE, S., et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2931-2935, 1999.
65. RIBEIRO F.C.; SCHUBACH A.; MOUTA-CONFORT E.; SCHUBACH T.M. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in dogs. **Vet Parasitol**. 30;148(3- 4):200-6. 2007.
66. REED, S. G. Diagnosis of Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 471-478, Sept./Oct. 1996.
67. 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. **J. Clin. Microbiol**. 38, 748- 751. 2000.
68. REITHINGER, R., DUJARDIN, J.C. . Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology** 45, 21–25. 2007.
69. RODGERS, M. R., S. J. POPPER, AND D. F. WIRTH. Amplification of kinetoplast as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitology** . 71:267-275. 1990.
70. RODRÍGUES N, DE LIMA H, AGUILAR C, RODRÍGUEZ A, BARKER D, CONVIT J 2002. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 96 (Suppl.): S1 105-S1 109. 2002.
71. ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇASILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M.; 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.

72. SALAM, M.A.; MONDAL, D.; KABIR, M.; EKRAM, A.R.M.S; HAQUE, R. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh . **Acta tropica**, vol. 113, n. 1, p. 52-55 . 2010.
73. SALOTRA, G.; SREENIVAS, G.P.; POGUE, N. L.; HIRA L. N.; RAMESH, V.; NEGI, N.S. Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of *Leishmania donovani* in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** vol. 39. p. 849-854. 2001.
74. SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 47, 349-358. 2003.
75. SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J. Med Res.** v. 123, p. 311-330, 2006.
76. SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M.D.Q.; BASU, D. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology** 105:183-192. 1992.
77. SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, v.39, p.560-3, 2001.
78. SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J Comp Pathol**, v.130, p.7-12, 2004.
79. SWENSON, C.L., SILVERMAN, J., STROMBERG, P.C. Visceral leishmaniasis in an English Foxhound from an Ohio research colony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n, 9, p. 1089-1092. 1988.
80. TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. . **Parasitologia Veterinaria**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010. 742 p.
81. TELLERIA, J., BOSSENO, M.F., TARIFA,T., BUITRAGO, R., MARTINEZ,E., TORREZ, M. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub andean focus of Bolivia identified by KDNA-polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 94, p. 5-6. 1999.

82. THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* **22**, 4673-4680, 2004.
83. UNIVERSITY OF NEBRASKA. ***Genetic Sequence Analysis Facility – Iniciadores selection for PCR*** <http://molbio.unmc.edu/courses/course-notes/chapter10.html>. Acesso em: 21 de junho de 2008.
84. VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T.; LE RAY, D. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. ***Veterinary Record***, v.141, n.13, p.328-330, 1997.
85. VITALE, F. et al. TaqMan- based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of New York Academy of Sciences*, v. 1026, p. 139-143, 2004.
86. WOLSCHRIJN, C.F.; MEYER, H.P.; HAZEWINKEL, H.A.W.; WOLVEKAMP, W.T. Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. ***Journal Small Animal Practice***, v.37, n.12, p.601-603, 1996.
87. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). ***Leishmaniasis: the global trend***. Geneva, jan. 2009. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/integrated\\_media\\_leishmaniasis/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html)>. Acesso em: 25 apr. 2009.