

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

MONOGRAFIA

**Diagnóstico do calazar canino: tecido *versus* protocolo de extração de DNA.
Qual a melhor opção?**

Kamila Nunes de Araújo

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

MONOGRAFIA

**Diagnóstico do calazar canino: tecido *versus* protocolo de extração de DNA.
Qual a melhor opção?**

Kamila Nunes de Araújo
Graduanda

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo
Orientadora

Patos
Setembro de 2009

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

A663d
2009

Araújo, Kamila Nunes de.

Diagnóstico do calazar canino: tecido *versus* protocolo de extração de DNA. Qual a melhor opção? / Kamila Nunes de Araújo. - Patos: CSTR /UFCG, 2009.

57p.: il. Color.

Inclui bibliografia.

Orientador: Márcia Almeida de Melo

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Zoonose – Monografia. 2 – Calazar canino I - Título

CDU: 616.993

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

KAMILA NUNES DE ARAÚJO
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Profa. Dra Marcia Almeida de Melo ORIENTADORA	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Sergio Santos de Azevedo EXAMINADOR	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo EXAMINADOR	_____ Nota

“Aos meus pais, Aparecida e Wilson que tenho um amor imensurável e ao meu esposo Felício por todo carinho e amor, dedico.”

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter derramado sobre minha vida suas bênçãos imensuráveis.

À minha mãe e grande amiga que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis e de vitória e que nunca mediu esforços para me ajudar, dando sempre o seu exemplo de determinação e coragem.

Ao meu pai, que sempre se esforçou para mim conceder a melhor educação.

Aos meus avós maternos (*in memorian*), aos quais eu não tive oportunidade de conhecer, mas sei que estão ao lado de Deus olhando por mim.

Aos meus avós paternos (*in memorian*), pelo carinho que sempre tiveram por mim e por serem sem dúvidas exemplo de simplicidade e determinação.

Ao meu grande amor Felício, pelo seu amor, carinho, companheirismo e dedicação imensuráveis, e por sempre me fortalecer em todos os momentos da minha vida.

À minha sogra D. Eunice, à minha cunhada Eliane, ao Cyro e ao Eduardo que apesar de não conhecê-los pessoalmente, tenho um grande apreço.

À minha querida madrinha Edileuza que amo tanto, pelo seu carinho e amor que sempre teve comigo.

Aos casais Antônio de Pádua e Célia, Clóvis e Maisa, meus vizinhos a 24 anos, os quais acompanham todas as etapas da minha vida e tenho grande apreço e afeto por vocês.

À Meire, Daniela, Davi, Ingrid e Kennedy meus amigos de infância, pelas brincadeiras, travessuras, arengas, pelas vitórias conquistadas e que a nossa amizade seja para sempre.

À Marileide e Marla pelo laço de amizade que fizemos, pelo o apoio emocional sempre que precisei.

À Milú (*in memorian*) e a Rita pelo carinho, amor e dedicação que tiveram em me ajudar com seus conselhos.

À Salete e a toda sua família pelo apoio que sempre recebi e por terem acreditado na minha capacidade.

À Talita pela nossa grande amizade que o tempo e a distância foram incapazes de destruir, e por está presente mesmo que de longe nesta etapa da minha vida.

À Laurycélia pela batalha que enfrentamos juntas de passar no vestibular e por nossa amizade.

À Camila pela dupla das Camilas, por nossa convivência, amizade e pelas batalhas que passamos uma sempre ajudando a outra.

À Mariana minha sobrinha do coração que amo tanto por ter tido o privilégio de acompanhar cada momento de sua vida do seu nascer até os primeiros passos.

À Inês que chamo de prima, e que realmente a tenho como prima do meu coração.

À Emily que chegou como “intrometida” na dupla das Camilas, mais que juntas construímos uma amizade verdadeira e batalhamos sempre juntas por nossos objetivos.

À Sâmya, tia Sônia e ao tio Ismael pelo carinho e afeto que sempre recebi de vocês, e por todo apoio emocional que me deram.

À Graça, Gilzane, Aline Antas, Tereza, Adriana, Expedito e ao Adílio que sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

À toda equipe do CCZ de Caicó-RN.

À toda equipe do laboratório (Aline, Annielle, Tereza, Expedito, Arthur, Camila, Gilzane, Elane, Maurina e Daniele), ao verdadeiro laço de amizade que surgiu entre nós.

À Edilene por todo apoio que me concedeu para que eu chegasse a essa etapa, por toda força e atenção.

À Profa. Norma, à Talícia, à Dr. Socorro e ao Dr. Rodrigo que foram verdadeiros anjos de Deus para ajuda da recuperação da minha Depressão.

Ao Dr. Leonardo, sua esposa Sibebe e a todos do Centro Médico Veterinário, pela amizade construída, e por terem sido uma ferramenta fundamental para construção da minha vida profissional.

À Dr. Flávia, à Dr. Janaína e a todos da Microlab, pelo apoio e incentivo na minha vida profissional e pessoal.

À Dr. Aline que sempre me apoiou a fazer Medicina Veterinária desde a inscrição do vestibular e pela nossa amizade.

À minha orientadora Profa. Márcia, ao Prof. Paulo e ao Fauzinho por serem peça fundamental na minha vida acadêmica e também na minha vida pessoal, por terem acreditado na minha capacidade e por estarem sempre ao meu lado me apoiando.

Ao professor Moraes pelo apoio na análise estatística.

À todos os professores que deixaram não só ensinamentos profissionais, mas ensinamentos para a vida inteira.

À todos os funcionários que direta ou indiretamente foram essenciais nesta etapa da minha vida.

À Spaik, Pretinha, Foguinho, Sol, Lype, Lili, Filó, Tob e Job, que fizeram com que cada vez mais eu me apaixonasse pela Medicina Veterinária.

E aos que participaram desta etapa da minha vida direta e indiretamente me apoiando e acreditando na minha capacidade, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Histórico</i>	16
2.2 <i>Agente etiológico</i>	17
2.3 <i>Aspectos epidemiológicos</i>	20
2.4 <i>Ciclo biológico</i>	22
2.5 <i>Características clínicas</i>	24
2.6 <i>Métodos de diagnóstico</i>	25
2.7 <i>Prevenção e controle</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 <i>Coleta das amostras</i>	34
3.2 <i>Local de execução</i>	35
3.3 <i>Leishmania chagasi</i>	35
3.4 <i>Protocolos de extração de DNA</i>	36
3.5 <i>Técnica de extração pela sílica</i>	36
3.6 <i>Técnica de extração pelo isopropanol</i>	37
3.7 <i>Dosagem de DNA</i>	37
3.8 <i>Procedimento da PCR</i>	37
3.9 <i>Análise estatística</i>	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Origem e dispersão da <i>Leishmania</i> .	17
Figura 2 - Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> de cultivo, coradas pelo Giemsa.	18
Figura 3 - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófago, coradas pelo Giemsa.	18
Figura 4 - Representação esquemática das formas evolutivas da <i>Leishmania</i> (promastigota flagelado e amastigota, no interior de um macrófago).	19
Figura 5 - A organização do kDNA.	20
Figura 6 - Distribuição mundial da leishmaniose visceral.	21
Figura 7 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .	23
Figura 8 - Fêmea de flebótomo (<i>Lutzomyia longipalpis</i>), ingurgitada.	23
Figura 9 - Cão com alopecia.	34
Figura 10 - Cão com esplenomegalia	34
Figura 11 - Coleta de medula óssea na tíbia.	35
Figura 12 - Coleta do baço.	35
Figura 13 - Concentração média de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtida na extração de baço, fígado, poplíteo, sangue e medula óssea utilizando kit comercial ou as técnicas de isopropanol e sílica.	40
Figura 14 - Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em $\mu\text{g/mL}$ obtidas nas extrações de tecidos com kit comercial.	40
Figura 15 - Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em $\mu\text{g/mL}$ obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de isopropanol.	41
Figura 16 - Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em $\mu\text{g/mL}$ obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de sílica.	41
Figura 17 - Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA da extração com kit comercial.	42
Figura 18 - Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA da	43

extração com a técnica de isopropanol.

Figura 19- Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA extraído com a técnica de sílica. **43**

Figura 20- Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA de *Leishmania chagasi* extraído pelas técnicas do kit comercial, do isopropanol e da sílica. **45**

Figura 21- Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) do DNA de *Leishmania chagasi* extraído pelas técnicas do kit comercial, do isopropanol e da sílica. **45**

Figura 22- Resultado da PCR de baço com DNA extraído com kit comercial. **47**

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de tecido de cão extraído com kit comercial, isopropanol e sílica, medida por fotometria.	39
Tabela 2 - Valores médios do grau de pureza do DNA de tecidos de cão extraído com kit comercial, pelas técnicas do isopropanol e da sílica e medido por fotometria.	42
Tabela 3 - Médias da concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de <i>Leishmania chagasi</i> , proveniente de cultura de promastigotas, extraído com kit comercial e com as técnicas do isopropanol e da sílica.	44
Tabela 4 - Médias do grau de pureza do DNA de <i>Leishmania chagasi</i> , proveniente de cultura de promastigotas, extraído com kit comercial e pelas técnicas do isopropanol e da sílica.	44
Tabela 5 - Resultado da PCR das amostras de linfonodo poplíteo, baço e fígado em relação aos três protocolos de extração de DNA.	47

RESUMO

ARAÚJO, KAMILA NUNES. Diagnóstico do calazar canino: tecido versus protocolo de extração de DNA. Qual a melhor opção? Patos, UFCG. 2009. 56 p (Monografia do Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

Este trabalho teve com objetivo avaliar o melhor tecido e a técnica mais eficaz na extração de DNA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina por PCR. Os tecidos utilizados foram baço, fígado, linfonodo poplíteo, medula óssea, *swab* conjuntival e sangue, provenientes de 18 cães naturalmente infectados, sendo 16 assintomáticos e 2 sintomáticos. O DNA foi extraído com kits comerciais e pelas técnicas do isopropanol e da sílica. Os resultados sugerem que a melhor associação de técnicas para o diagnóstico do calazar canino por PCR inclui o uso do linfonodo poplíteo como fonte de DNA e o emprego de kits comerciais de extração para a purificação de DNA. Nas condições aqui descritas, a sensibilidade da PCR alcançou 72% numa amostra em que 88% dos cães eram assintomáticos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, PCR, cão, *Leishmania chagasi*, tecido, extração de DNA

ABSTRACT

ARAÚJO, KAMILA NUNES. Diagnostic of canine kala-Azar: tissue *versus* DNA extracion method. What is the best option? Patos, UFCG. 2009. 56 p (Monograph of the Veterinary Medicine Course, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health)

The purpose of this work was to evaluate the best source tissue and the most efficient DNA extraction method for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by PCR. Samples were taken from spleen, liver, popliteal lymph node, bone marrow, conjunctiva and peripheral blood of naturally infected dogs, from which 16 were asymptomatic and 2 symptomatic. DNA extraction was performed with commercial kits and isopropanol or sílica methods. The results suggest that the best association includes the extraction of DNA from popliteal lymph node using a kit. In the conditions described here, the PCR sensitivity reached 72% in a sample where 88% of the dogs were asymptomatics.

Keywords: visceral leishmaniasis, PCR, dog, *Leishmania chagasi*, tissues, DNA extraction methods

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave que afeta o homem e os animais, com prognóstico reservado e na maioria dos casos é fatal.

É causada por espécies do gênero *Leishmania* que pertencem à família Trypanosomatidae, tem como reservatórios o cão e animais silvestres, e como vetores, insetos dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Seu ciclo biológico é realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, apresentando morfologias típicas para cada um.

No Novo Mundo diversas ordens de mamíferos silvestres (reservatórios naturais) e várias espécies de flebotomíneos (vetores) estão envolvidas na transmissão da leishmaniose. A maioria dos casos de infecções humanas está relacionada com hábitos, atividades primárias ou secundárias de indivíduos que exploram ou habitam florestas. Recentemente tem ocorrido um aumento significativo nos casos de leishmanioses em áreas peri-urbanas de grandes cidades, particularmente no Brasil.

A LV é uma doença severa, que acomete principalmente crianças, podendo causar a morte quando não tratada a tempo. O cão é o reservatório doméstico mais importante entretanto, para esta espécie, não há tratamento, restando apenas o sacrifício.

O diagnóstico pode ser realizado por exames parasitológicos de punção de medula ou baço, ou por técnicas sorológicas que são menos invasivas, mais sensíveis e específicas como o teste de aglutinação rápida e o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - Ensaio imunoenzimático). Diagnóstico de infecção assintomática por sorologia é insuficiente e PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) aumenta significativamente a sua sensibilidade.

Com o avanço da biologia molecular, a técnica da PCR tem sido promissora na confirmação do diagnóstico por possuir uma maior especificidade e não permitir falsos negativos em função dos iniciadores direcionados para amplificação de DNA (*deoxyribonucleic acid* – ácido desoxiribonucléico) de minicírculo.

Apesar do crescimento do uso da PCR no diagnóstico para leishmaniose não se sabe ao certo qual o tecido de melhor eleição, aquele que garanta mais positividade. Vários protocolos de extração do DNA são propostos, desde àqueles extremamente laboriosos e com uso de produtos que são tóxicos, mas por sua vez de custo mais baixo, até os realizados com kits comerciais que são rápidos, mas de custo elevado.

Tendo em vista a inexistência de um consenso sobre a melhor combinação entre fonte de DNA e método de extração para o diagnóstico do calazar canino por PCR, este trabalho teve por objetivo avaliar o melhor tecido e a técnica mais eficaz de extração de DNA para o diagnóstico desta enfermidade em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Em 1903 William Leishman descreve os parasitas numa distensão de polpa esplênica obtida *post-mortem* de um soldado inglês que tinha retornado da região de Dum-dum com disenteria e hepatoesplenomegalia, por isso o nome febre Dum-dum, febre de Assam (uma região da Índia), e Kala-azar (do indu *kala*, negro, e *azar*, doença). No mesmo ano este achado é confirmado por Charles Donovan e em 1904, Roger isola o parasita em cultivo, descrevendo a sua forma flagelada (SETÚBAL, 2009).

Com o aparecimento dos casos de Leishmaniose visceral (calazar) em humanos no velho mundo, já no início do século, Migone (1913) diagnostica no Paraguai o primeiro caso autóctone brasileiro proveniente do estado de Mato Grosso (COSTA et al, 1995).

Segundo Deane (1938), a infecção na maioria das vezes era contraída em domicílio, por ser mais encontrada em crianças, por estarem as habitações em geral situadas dentro da mata, por ser nelas e em suas proximidades, a concentração dos insetos prováveis transmissores, maior do que em ambientes silvestres.

Foram Deane & Deane (1954), que constataram pela primeira vez a infecção natural da *Lutzomyia longipalpis* por formas promastigotas da *Leishmania chagasi*, por serem insetos procedentes de uma área que constituía um foco ativo de calazar e onde foram encontrados, além de casos humanos, cães e raposas com leishmanias nas vísceras e na pele.

Foi constatado pela primeira vez a infecção natural de uma raposa com *Leishmania chagasi*, com exames dos esfregaços e impressões, onde foram observados leishmanias extra e intracelulares no baço e no fígado, mais numerosas na medula e com mais abundância na pele do focinho. A ocorrência de leishmanias tão abundantes na pele sugere que esse mamífero, muito comum na área endêmica de calazar do Ceará, serve como reservatório campestre do parasito (DEANE & DEANE, 1954).

Em 1984, um gambá, *Didelphis albiventres* do município de Jacobina, no estado da Bahia, foi encontrado com infecção natural pela *Leishmania chagasi*, sendo o primeiro mamífero silvestre não-canídeo a ser achado com o agente do calazar nas Américas (SHERLOCK et al, 1984).

2.2. Agente etiológico

Os agentes causadores da LV são membros do Complexo *Leishmania donovani*, classificados por três espécies: *Leishmania donovani*, que prevalece em Timor na África, Índia e partes do Oriente Médio; *Leishmania infantum*, que prevalece na Europa, Norte da África do sul e América central (LUKES et al, 2007); e a *Leishmania chagasi* que prevalece no Brasil (JESUS et al, 2009).

Estudos sugerem que a taxonomia do complexo *Leishmania donovani* precisa ser revisto. Com base nas análises de RAPD (Random Amplification of Polymorphic) e seqüências de DNA, a *Leishmania chagasi* tem sido sinônimo de *Leishmania infantum*, que é condizente com uma introdução desta espécie no novo mundo (MAURÍCIO et al, 2000 apud LUKES et al, 2007).

Lukes et al, 2007 propôs através de estudos com marcadores moleculares que o ancestral das leishmanioses do Novo Mundo evoluíram na América do Sul no Paleoceno ou Eoceno ilustrado na figura 1.

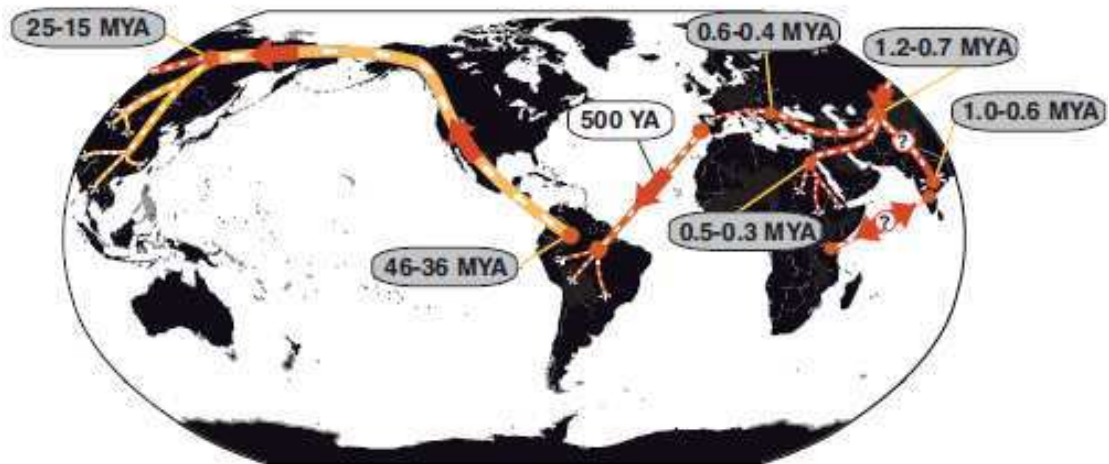


Figura 1. Origem e dispersão da *Leishmania*. O ancestral do grupo *L. donovani* teria evoluído a partir de parasitas monoxênicos de inseto da América do Sul $\approx 46-36$ Mya (*Million years ago* – milhões de anos atrás) e mudou-se para a Ásia através do Estreito de Bering (linha amarela). O ancestral do complexo *L. donovani* divergiram das outras espécies de *Leishmania* $\approx 14-24$ Mya (linha vermelha). Este ancestral chegou na Ásia central e 1 Mya divergiram em *L. infantum* Européia, *L. donovani* Africana Indiana / *L. donovani* Queniana. *L. infantum* mais tarde foi introduzida na América do Sul pelos colonizadores europeus, ao passo que a *L. donovani* teria sido transferida por Imigrantes / escravos provenientes da Índia e Quênia, e / ou hora vice-versa. Estimativas com base em nossos dados estão em cinza, aqueles em brancos são retirados da literatura publicada. (adaptado de LUKES et al, 2007)

Como todos os membros da família Kinetoplastida, o protozoário *Leishmania* apresenta um cinetoplasto, um núcleo e um único flagelo. Todas as espécies do gênero

Leishmania têm duas formas no seu ciclo de vida: uma forma promastigota (figura 2), no inseto vetor, e uma forma amastigota (figura 3), no hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são as formas encontradas no aparelho digestivo do vetor, estas formas móveis com 10-20 μm de comprimento e 1,5-3,0 μm de largura, possuem um flagelo livre, de comprimento variável, que emerge do corpo basal da extremidade anterior da célula, conferindo mobilidade ao parasita. O mesmo autor afirma que no hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas surgem como formações ovóides ou arredondadas, com 2,5 a 6,8 μm de comprimento, sem flagelo livre. São formas obrigatoriamente intracelulares, parasitando as células fagocíticas mononucleares. Em preparações coradas pelo método de Giemsa (figura 3 e 4) distingue-se um citoplasma azul pálido limitado por uma membrana. No meio do citoplasma observam-se duas organelas coradas de vermelho, o núcleo, relativamente grande e situado no pólo posterior da célula, e o cinetoplasto, mais pequeno, em forma de bastonete e em posição anterior relativamente ao núcleo (ROLÃO, 2004).

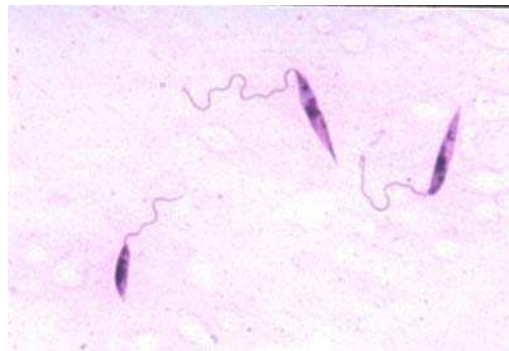


Figura 2: Formas promastigotas de *Leishmania* de cultivo, coradas pelo Giemsa
Fonte: WHO/TDR/Stammers/Image Library (2009)

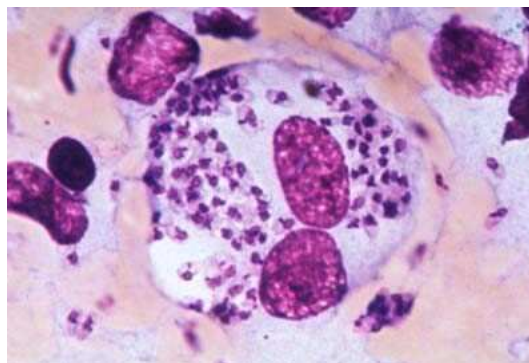


Figura 3: Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófago, coradas pelo Giemsa
Fonte: WHO/TDR/ Stammers/Image Library (2009)

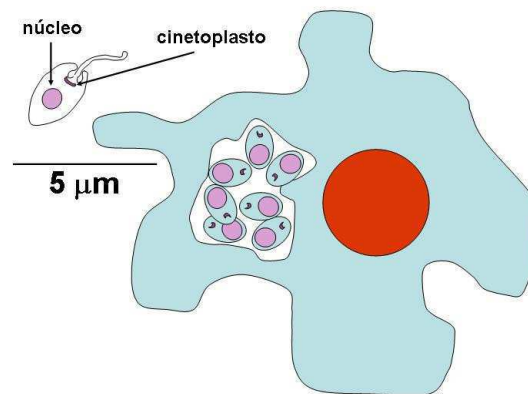


Figura 4: Representação esquemática das formas evolutivas da *Leishmania* (promastigota flagelado e amastigota, no interior de um macrófago). A escala serve às duas formas.

Fonte: < http://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/origem_classificacao.htm>

A *Leishmania infantum* (similar a *Leishmania chagasi*) tem um genoma com 36 cromossomos, 8.154 genes, 41 pseudogenes, (PEACOCK et al, 2007) e, como os demais tripanossomatídeos, um DNA mitocondrial (kDNA) organizado em rede constituída de maxicírculos e minicírculos (ENGLUND et al, 1996). O kDNA dos tripanossomatídeos, em geral, consistem em um número aproximado de 5×10^3 a 5×10^4 de minicírculos, e possui valores aproximados de 20 a 50 maxicírculos que são idênticos a moléculas conectadas em rede (SIMPSON, 1986).

Os maxicírculos assemelham-se ao DNA mitocondrial, como os de mamíferos ou leveduras, em que eles codificam RNAs ribossomais e um pequeno número de proteínas. Em contraste, a função genética dos minicírculos era um mistério há anos, mas foi descoberto que eles codificam RNAs pequenos que controlam a especificidade da edição de RNA. A microscopia eletrônica e de fluorescência indicam que a rede está compactada em um disco de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diâmetro e $0,4\mu\text{m}$ de espessura (figura 5). (ENGLUND et al, 1996).

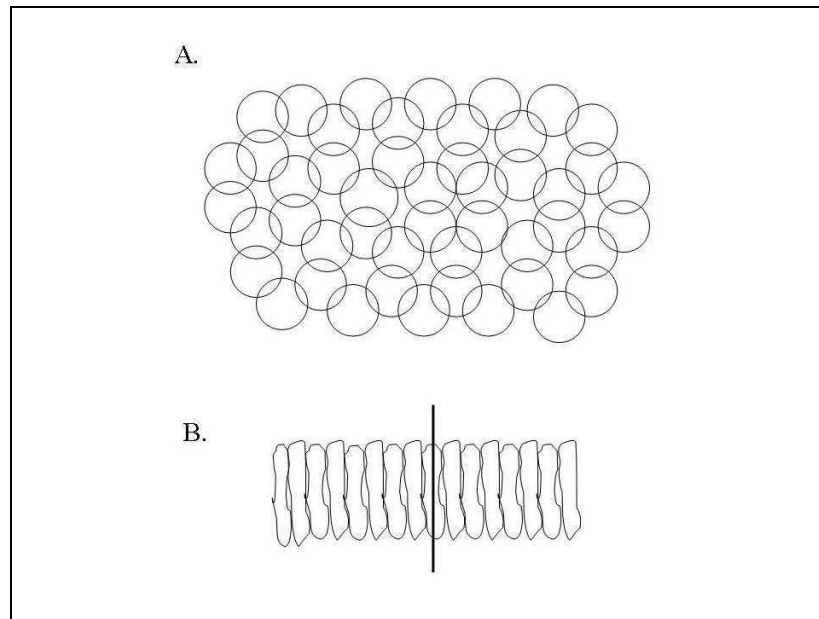


Figura 5: A organização do kDNA. **A:** representação esquemática de uma rede isolada. **B:** a organização de uma rede de kDNA in vivo. Este diagrama mostra uma secção através do disco do cinetoplasto. A linha vertical representa o eixo do disco. Os maxicírculos não são mostrados nesses modelos (adaptado de ENGLUND et al, 1996).

2.3. Aspectos Epidemiológicos

A LV é uma das doenças mais importantes da atualidade, principalmente em crianças, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida e pacientes submetidos a quimioterapia. A LV é letal em aproximadamente 95% dos casos, na ausência de tratamento (BRASIL, 2006).

Sessenta e cinco países são considerados endêmicos para LV (Figura 6) e estima-se que 200 milhões de pessoas estão sob condições de risco de contaminação. O número de óbitos anuais registrados chega a 59.000 e este é somente ultrapassado pelo número de mortes causadas pela malária dentre as doenças parasitárias (ALVAR et al, 2006).

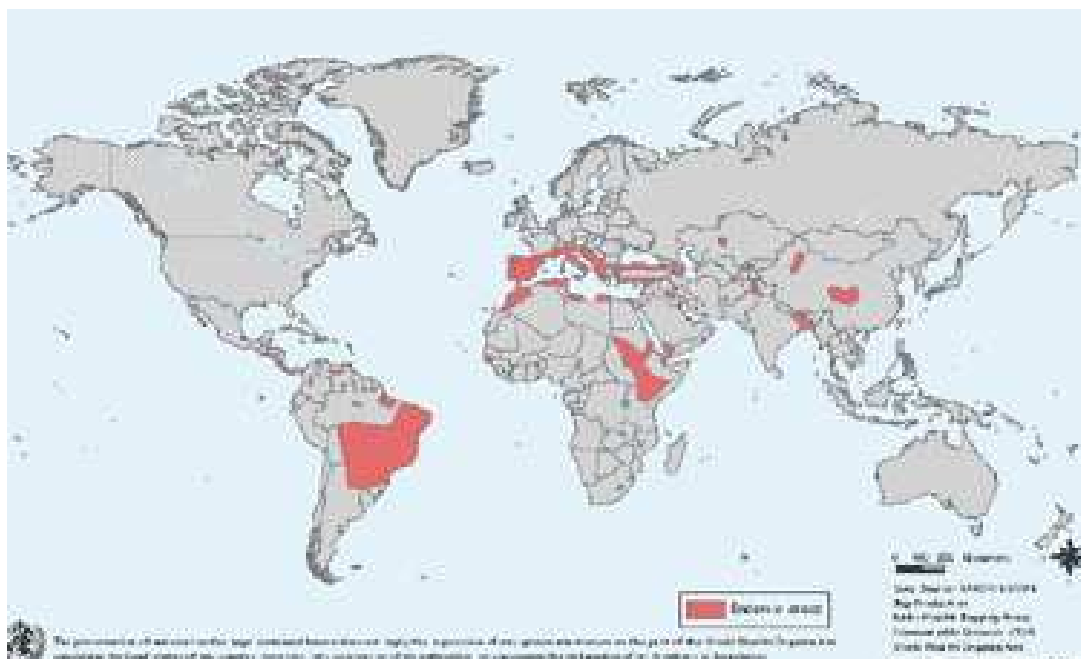


Figura 6: Distribuição mundial da leishmaniose visceral
Fonte: WHO, 2009.

Dada a ampla abrangência e o significativo aumento de casos da doença, o Programa Especial de Pesquisas e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR), vinculado à OMS (Organização Mundial da Saúde), considera a leishmaniose uma prioridade em suas pesquisas dentre as 10 principais endemias tropicais do mundo (WHO, 2009).

Especificamente em relação ao Brasil, a LV demonstra ampla distribuição atingindo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Por isso, a LV possui aspectos geográficos e sociais bem diferenciados e complexos. Das 27 unidades federativas do país, 19 possuem casos autóctones registrados da doença totalizando cerca de 1.600 municípios afetados. A região Nordeste concentrou mais de 90% dos casos humanos na década de 90 e atualmente responde por 67% do total de casos no país (ELKHOURY, 2005).

O ambiente favorável à ocorrência de LV é o de baixo nível socioeconômico, pobreza e promiscuidade, prevalentes em grande parte no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vêm se modificando, principalmente nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, onde a LV se encontra urbanizada (LUZ et al, 2001; BRASIL, 2006). Condições sócio-ambientais, como o desmatamento, reduziram a disponibilidade de animais que serviam como fontes de alimentação para o mosquito transmissor, colocando o cão e o homem como fontes de alimentação alternativas acessíveis (BRASIL, 2006).

O Brasil detém a maior parte de casos registrados de LV na América Latina (MILES et al, 1999). Seu comportamento epidemiológico é cíclico, com elevação do número de casos em intervalos médios de 5 anos (ELKHOURY, 2005).

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, no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone. (BRASIL, 2006).

De acordo com Batista (2008) num inquérito epidemiológico no município de Caicó no Rio Grande do Norte executados com o teste sorológico ELISA S7, de 358 cães analisados, 18 animais foram reagentes, determinando uma prevalência estimada de 5,02% e em uma amostra de 70 cães trazidos ao centro de controle de zoonoses de Caicó 6 (8,5%) animais foram reagentes ao teste de ELISA S7.

No município de Sousa/PB, em um inquérito canino realizado no raio de 300 m de um caso de leishmaniose visceral infantil que veio a óbito, 29,5 % dos cães foram soro-positivos pelo ELISA S7 (informação verbal¹).

2.4. Ciclo biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* (figura 7) é um processo onde a transmissão do parasita para os hospedeiros vertebrados é efetuada por insetos dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* (figura 8) no Novo Mundo, verificando-se uma elevada especificidade entre a espécie de *Leishmania* infectante e a espécie do inseto vetor (ROLÃO, 2004).

¹ Profa.Dra. Marcia Almeida de Melo, Profa. Adjunta da UFCG, em setembro 2009.

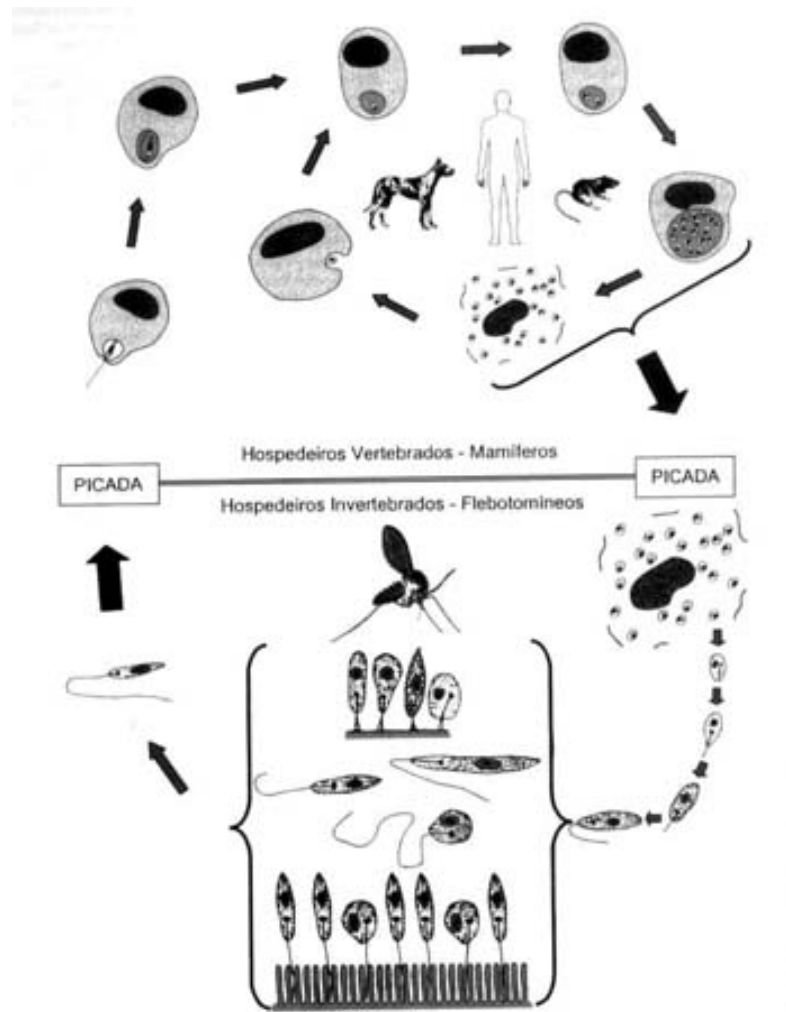


Figura 7: ciclo biológico da *Leishmania*
Fonte: < www.parasitologia.com/protozooses.htm >



Figura 8: fêmea de flebótomo (*Lutzomyia longipalpis*), ingurgitada
Fonte: Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da saúde, 2006.

Os vetores têm uma atividade noturna e os machos se alimentam de sucos de plantas. Apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão do parasita, uma vez que necessitam de realizar repasto sanguíneo para maturação dos seus ovos (ROLÃO, 2004). O mesmo autor afirma que a maioria das infecções ocorre como zoonoses de animais silvestres ou domésticos e o homem é infectado acidentalmente, quando exposto ao ciclo natural de transmissão. Os reservatórios mais comuns da leishmaniose visceral são os canídeos (cães, chacais e raposas), contudo a espécie *Leishmania donovani* produz infecções antroponóticas, sendo o homem, provavelmente, o único hospedeiro.

Quando a fêmea do flebótomo, para maturação dos seus ovos, efetua o repasto sanguíneo, ingere os protozoários na sua forma amastigota. Os parasitas ingeridos juntamente com o sangue passam diretamente para o segmento abdominal do intestino médio do vetor (BLACKBURN et al, 1988). Com o progredir da digestão, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicos e estes, 3 ou 4 dias após a refeição sanguínea, transformam-se em promastigotas longos e flagelados (SCHLEIN et al, 1991).

No próximo repasto, a fêmea infectada regurgitam os promastigotas metacíclicos que são fagocitados pelos macrófagos da pele, onde se transformam em amastigotas. As formas amastigotas iniciam um processo de multiplicação ativa, acabando por provocar a destruição da membrana celular da célula hospedeira e subsequente liberação dos parasitas que vão infectar novos macrófagos. Os parasitas fagocitados podem invadir as células do sistema fagocítico mononuclear no baço, fígado, medula óssea, linfonodos e outros órgãos linfóides causando a leishmaniose visceral (DEDET & PRATLONG, 2008).

2.5. Características clínicas

Silva et al (2001) observaram em 98 animais soropositivos para LV um ou mais sinais clínicos como: alopecia, emagrecimento, dermatites, onicogribose, ceratoconjutivite, descoordenação motora, pneumonia, secreção ocular, hiperqueratose, caquexia e lesões no corpo, principalmente nas orelhas, em volta dos olhos, nariz, região genital e patas.

Em alguns cães, a doença pode permanecer latente, levando inclusive à cura espontânea. No Brasil, a forma assintomática da doença geralmente representa 40 a 60% de uma população soropositiva, e há evidências que as taxas de prevalência são maiores que as obtidas por estudos sorológicos. A existência de cães assintomáticos parasitados com ou sem anticorpos tem sido observada em infecções naturais e experimentais (FARRELL, 2002). Já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para

flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (PALATINICK et al, 2001).

França-Silva (1997) avaliou a prevalência de LV em várias raças de cães e encontrou taxas de prevalência entre 5,5% (Chihuahua) e 26% (Cocker). Oito raças (Dalmata, Weimaraner, Boxer, Husky Siberiano, Pastor Belga, Fox Terrier, Dog Alemão e o Cocker) apresentam a taxa de prevalência observada maior que a taxa de prevalência esperada, traduzindo por raças com probabilidade maior de serem acometidos pela LV.

O mesmo autor avaliou a prevalência de LV das raças quanto ao tipo de pelagem, classificando sete raças (Poodle, Pastor Alemão, Chihuahua, Pequinês, Husky Siberiano, Pastor Belga e o Cocker) como raças de pêlo longo e dez raças (Fila, Pinscher, Dalmata, Dachshund, Weimarener, Doberman, Boxer, Pointer Americano, Fox Terrier e o Dog Alemão) como raças de pêlo curto. A taxa de prevalência variou entre 8,9% para raças com pêlo longo e 11,9% para raças com pêlo curto chegando a conclusão que possivelmente, o pêlo longo dificulte o acesso dos flebotomíneos ao tecido cutâneo, evitando a realização do repasto sanguíneo, que pode ser feito obviamente em áreas menos pilosas, o que vem justificar a existência de cães com esta característica fenotípica também infectados.

Foi avaliado também por França-Silva (1997) a prevalência de LV por aptidão das raças, por idade e por sexo. Quanto a aptidão racial, os cães Retrievers e Levantadores d'água têm 4 vezes mais chances de contrair a infecção do que animais de companhia. Com relação a idade do cão não constituiu fator de risco para contrair a LV, e em cães machos e fêmeas ambos têm a mesma probabilidade de contrair a infecção.

2.6. Métodos diagnósticos

2.6.1. Exames parasitológicos

2.6.1.1. Citologia e histologia

A observação microscópica de amastigotas de *Leishmania* em aspirado ou *imprints* de tecidos (incluindo a pele, baço, medula óssea e gânglios linfáticos) é considerada como conclusiva (GIUNCHETTI et al, 2008). A especificidade da citologia é de aproximadamente 100% e a sensibilidade depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos (BRASIL, 2006).

Histopatologia de órgãos infectados corados com HE (hematoxilina e eosina) também tem sido utilizado para detectar a presença de parasitas. Pesquisas longas podem ser necessária para ver os amastigotas uma vez os organismos não são frequentemente reconhecidos (XAVIER et al, 2006). Histopatologia de tecidos com o uso de imunohistoquímica é útil para aumentar a sensibilidade de detecção quando uma baixa carga parasitária está presente (TAFURI et al, 2004).

Apesar da baixa sensibilidade da técnica, Moreira et al (2007) constatou uma sensibilidade de 92,68%, 76%, 100% para grupos de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente, obtendo uma maior detecção no linfonodo quando comparado com outros órgãos (baço, medula óssea e fígado).

2.6.1.2. Cultura

Segundo Maia & Campino (2008), os meios de cultura utilizados podem ser monofásicos, tais com Schneider's, M199, RPMI, BHI (Brain Heart Infusion) e Grace's ou bifásicos quando associado com o meio NNN (Novy-McNeal-Nicolle). O meio é inoculado com gotas do aspirado ou com o homogeneizado ou fragmento do órgão e incubado a uma temperatura entre 22° e 26° C. As culturas são examinadas semanalmente para a presença de formas promastigotas. Parasitas podem ser vistos na 1ª semana, embora subculturas semanais em meios frescos podem ser necessário para visualizá-los. Em geral, uma cultura é considerada negativa na sequência de quatro sucessivas subculturas negativas.

Segundo Barrouin-Melo (2004), a sensibilidade da cultura do baço para diagnóstico de *L. chagasi* foi de 73,4%, e da cultura do linfonodo foi de 18,8%, ambos utilizando a sorologia como referência. Considerando apenas os animais com infecção confirmada pela cultura, a sensibilidade da cultura do baço para diagnóstico de *L. chagasi* foi 97,9%, e da cultura do linfonodo foi 25%.

Apesar de 100% de especificidade, as culturas são hoje menos utilizados para o diagnóstico devido aos seus inconvenientes, como a demora no resultado, a susceptibilidade à contaminação microbiológica, dependência em relação à carga parasitária e, por vezes, dificuldade de se realizar devido à má adaptação de isolar o parasita no meio de cultura. Por outro lado, ainda é necessário um número suficiente de parasitas para a classificação por isoenzimas, para uso do antígeno como diagnóstico imunológico, para modelos de infecção experimental, bem como na avaliação *in vitro* de drogas ou mesmo identificação molecular (MAIA & CAMPINO, 2008).

2.6.2. Testes Sorológicos

Testes sorológicos têm vários problemas intrínsecos incluindo a persistência de anticorpos específicos após recuperação e reações cruzadas com anticorpos contra outros agentes patogênicos, tais como *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis* (FERREIRA et al, 2008). Altos níveis de sensibilidade e especificidade são necessários para evitar resultados falso-negativos, que subestime a taxa de infecção de *Leishmania* em cães de áreas endêmicas, bem como reações falso-positivas que podem conduzir à eutanásia desnecessária de cães não infectados (MAIA & CAMPINO, 2008).

Apesar da produção de anticorpos ser baixa na fase inicial e final ou em infecções assintomáticas, cães infectados geralmente desenvolvem títulos de anticorpos aumentando gradualmente ao longo do tempo (OLIVA et al, 2006). Cães sintomáticos, além de alterações hematológicas e de proteínas, podem desenvolver uma forte resposta humoral (CAMPINO et al., 2000). Contudo, a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em si não é um sinal conclusivo da doença, sendo aconselhável executar mais de um teste sorológico, para confirmar o diagnóstico da leishmaniose canina (CAMPINO, 2002).

2.6.2.1. Reação de fixação do complemento

A reação de fixação do complemento (RFC), atualmente em desuso, foi bastante realizada na década de 1930, quando se utilizava o antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Apresentava resultados promissores com elevada sensibilidade e especificidade, no entanto, nesse método pode ocorrer reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas, sífilis e blastomicose (GENARO, 2004 apud DOURADO et al, 2007).

2.6.2.2. CIE (*Counterimmunoelectrophoresis* – contra-imunoeletoforeses)

CIE é uma técnica qualitativa para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* desenvolvido por Barbosa et al (1973) apud Maia & Campino (2008), é baseada na visualização de um arco precipitação azul em uma tira de cellogel® devido à interação entre os antígenos de *Leishmania* e os anticorpos presentes na amostra de soro submetidos à eletroforese que é corada pelo corante Coomassie Blue.

Mancianti & Meciani (1988) obtiveram com esta técnica uma sensibilidade de 96,1% em cães com quadro clínico grave de leishmaniose, 80% em animais com sinais leves da

doença e 72,7% em cães assintomáticos; especificidade foi de 100% para os cães saudáveis e 90,5% para cães com outras doenças.

2.6.2.3. RIFI (Reação de imunofluorescência indireta)

Este método é considerado o teste de eleição pelo Ministério da Saúde do Brasil, nos inquéritos caninos por demonstrar uma sensibilidade que varia de 90 a 100% e uma especificidade de aproximadamente 80% nas amostras de soro, além de ser um teste de fácil execução, rápido na emissão do resultado e ter baixo custo (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

É uma metodologia que utiliza formas promastigotas do parasito, que a limitam em termos de especificidade e reprodutibilidade (SUNDAR & RAI, 2002). Os antígenos mais utilizados são promastigotas fixados em lâminas e amastigotas provenientes de fígado e baço de hamsters (DOURADO et al, 2007). O resultado considerado sororreagente é aquele que possua título igual ou superior a diluição 1:40 (BRASIL, 2006).

A RIFI é uma técnica limitada pela ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar, além de ocorrer falha diagnóstica em estágios iniciais da doença, quando anticorpos da classe IgG ainda não são detectáveis. Por este motivo, quando utilizada de maneira isolada, pode subestimar a prevalência e a incidência, prejudicando os métodos de controle (SUNDAR & RAI, 2002; TRONCARELLI, 2008).

2.6.2.4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima)

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis ou purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente e os anticorpos específicos no soro se fixam aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando é adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade óptica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo (BRASIL, 2006).

Na leishmaniose visceral os métodos sorológicos, como a RIFI e o ELISA são os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) para realização de inquéritos epidemiológicos caninos, através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e no diagnóstico da doença no homem (ALVES & BEVILACQUA, 2004; COSTA & VIEIRA, 2001).

Mettler et al (2005) ao usar a técnica teve uma alta sensibilidade em cães assintomáticos (94,1-100%) e sintomáticos (100%), utilizando ELISA, baseado em antígenos solúveis derivados de promastigotas ou *Leishmania infantum* em forma de amastigota.

Uma preferência crescente pelo ELISA tem sido observada nos laboratórios de diagnóstico em todo o mundo, por permitirem testar um grande número de amostras, com elevada sensibilidade e especificidade, utilizando antígeno recombinante ou mesmo antígenos totais do parasito (MELO, 2006).

O uso de antígenos bruto, quer promastigotas ou amastigotas completos ou extratos solúveis destes, limitam a sua especificidade. O DNA recombinante, tecnologia que levou à clonagem molecular de vários genes que codificam proteínas antigênicas de *Leishmania*, pode ser utilizado para desenvolver sorodiagnóstico com antígenos mais específicos (MAIA & CAMPINO, 2008).

A comparação entre o extrato bruto de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e os antígenos recombinantes rK39 e rK26 no diagnóstico da leishmaniose visceral canina por ELISA, demonstram valores similares quanto à sensibilidade e especificidade, entretanto, há reação cruzada com infecções provocadas por *T. cruzi* e *Dirofilaria immitis* quando o antígeno total de *L. amazonensis* é empregado e com infecções por *Babesia canis*, *T. cruzi* e *D. immitis* quando *L. chagasi* é empregada, o que não é observado com os antígenos recombinantes (ROSÁRIO et al, 2005).

O desenvolvimento de ensaios sorológicos baseados em antígenos definidos foi e continua sendo um paradigma da busca por melhores métodos diagnósticos para as leishmanioses (MELO, 2006).

2.6.2.5. DAT (*Direct agglutination test* – teste de aglutinação direta)

Segundo Alves & Bevilacqua (2004), este método pode ser utilizado como alternativa aos testes de ELISA e imunofluorescência indireta, pois em trabalhos comparativos com estes, o DAT demonstrou ser igualmente sensível e específico.

Por ser de baixo custo e de fácil execução o torna ideal tanto para campo como para uso em laboratório (MEREDITH et al, 1995). Em vários estudos com cães de áreas endêmicas para a leishmaniose visceral, o DAT foi encontrado em 70,6% (MOHEBALI et al, 2004) e 100% (SILVA et al, 2005) sensíveis e 84,9% (MOHEBALI et al, 2004) e 97,8% (SILVA et al, 2005) específicos. Uma das limitações do DAT é relativamente longo período de incubação (18h) e o fato de que diluições seriadas de sangue ou soro devem ser feitas, que faz o teste trabalhoso e não é adequado para a análise de grande número de amostras (HARITH et al, 1989). Todavia o desenvolvimento de um antígeno liofilizado faz o DAT muito adequado para o uso em condições de campo uma vez que se mantém estável em altas temperaturas (MEREDITH et al, 1995).

2.6.2.6. Testes imunocromatográficos

As técnicas imunocromatográficas apresentam diversos sistemas acoplados e são vistas como métodos vantajosos. Os principais métodos são: imunoblot, ensaios receptores, ensaios inibidores de enzimas e sistemas enzimáticos com proteína A ligada a corantes específicos (WELLER, 2000).

França-Silva, 1997 obteve 92,16% de sensibilidade e 99,52% de especificidade usando o teste de diagnóstico Trald (Teste rápido Anticorpo *Leishmania donovani*) o mesmo autor descreve que se trata de um teste imunocromatográfico realizado em uma fita de papel de cromatografia produzida pela Corixa Corporation, Seattle, WA, USA, constituída por 3 regiões: 1. Região com proteína-A ligada ao ouro coloidal na forma liofinizada; 2. Região com zona de antígeno imobilizado rK39; 3. Região controle com Anti-proteína-A imobilizada.

2.6.3. Métodos Moleculares

2.6.3.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase)

Em meados da década de 80, o advento da utilização da tecnologia da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) concebida por Kary Mullis (SAIKI et al, 1988; MULLIS, 1990), que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase, causou uma revolução nos estudos envolvendo os microrganismos, tanto de organismos cultivados

como daqueles isolados diretamente do hospedeiro, utilizando oligonucleotídeos específicos (BARKER et al, 1991; DE BRUIJN & BARKER, 1992; SMYTH et al, 1992).

A reação em cadeia pela polimerase PCR é uma atrativa alternativa para o diagnóstico neste contexto, e amostras não invasivas tem grande importância porque eles são simples, indolores e tem menos resistência do cão e do proprietário (FERREIRA et al, 2008).

Nos estudos com leishmaniose visceral, o PCR tem sido utilizado com várias finalidades além de diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos. Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso do PCR para o diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando o sangue periférico, porque a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO & MELO, 2004).

Estudos de avaliação da PCR de diferentes tecidos de cães infectados têm mostrado resultados variáveis e às vezes conflitantes (BANETH & AROCH, 2008). Parte da vasta gama de sensibilidade observada entre os diferentes estudos podem ser explicada pela distribuição heterogênea dos parasitas em cada tecido ou órgão, da carga parasitária associados com tropismo *Leishmania*, tensão e resposta imune local (MAIA et al, 2009).

Além disso, a eficácia da técnica de PCR dependerá de diferentes fatores, tais como iniciadores (primers), número de cópias do alvo, o método de extração de DNA, material biológico e protocolo de PCR (ALVAR et al, 2004; BANETH & AROCH, 2008).

Os métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) para detecção de RNA (*ribonucleic acid*) e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita. Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro, podem ser utilizados como fonte de material para as reações (TAVARES et al, 2003), mais ainda não se sabe ao certo qual o tecido de eleição para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Em cães, Ferreira et al (2008) encontraram uma alta positividade em amostra de *swab* conjuntival associando a PCR com a hibridização, Lachaud et al (2001) observaram alta sensibilidade ao utilizar coágulo sanguíneo, Solano-Gallego et al (2009) encontraram 51% de positividade em pele, Andrade et al (2006) 87,2% de positividade em pele, 84,6% em baço e 80,0% em fígado, Maia et al (2009) avaliam a melhor alternativa entre baço, linfonodo e medula óssea e Troncarelli (2008) obteve positividade de 76% em baço e 72% em fígado. Em

cães sintomáticos e assintomáticos Soares et al (2005) encontraram 100% e 13,33% de positividade respectivamente na avaliação de baço, fígado e linfonodo. Não há ainda um consenso sobre qual o melhor tecido ou material para a obtenção de DNA amplificável por PCR, mas os autores buscam sempre a aquisição de amostras de forma menos invasiva e protocolos com baixo custo.

Na purificação de DNA para a realização da PCR, vários reagentes são utilizados (SAMBROOK et al, 2003), sendo o fenol-clorofórmio-álcool isoamílico o protocolo mais empregado; entretanto, a toxicidade do fenol, implica em muita cautela na preparação e no descarte do reagente para evitar agravos à saúde. Protocolos alternativos podem ser utilizados e, com o avanço tecnológico em biologia molecular, vários kits comerciais estão disponíveis, reduzindo o tempo de extração, aumentando a segurança do pesquisador, além da qualidade e da quantidade no DNA extraído (AUSUBEL et al, 2002).

2.6.3.3. PCR – “real time” (*Polymerase Chain Reaction real time* - reação em cadeia da polimerase em tempo real)

PCR em tempo real também pode ser usado para a detecção e diagnóstico de microrganismos pertencentes a um mesmo gênero. Isso permite não só uma detecção exata e quantificação de DNA específica em várias amostras biológicas, mas também permite que as espécies ou estirpes de vários microrganismos patogênicos importantes possam ser diferenciadas por análise da fusão da curva de fluorescência dos produtos da PCR (LOGAN et al, 2001). Neste contexto, *L. major* foi diferenciada de *L. donovani* e de *L. tropica* e *L. infantum*, de acordo com a temperatura de fusão, que é uma função da proporção GC / AT (G - Guanina, C – Citosina, A - Adenina, T - Timina), comprimento e sequências de nucleotídeos do produto amplificado. A análise da curva oferece uma alternativa rápida para identificação de diagnóstico de espécies ou estudos epidemiológicos da leishmaniose e o parasitismo assintomático (NICOLAS et al, 2002).

É uma técnica de rápida execução e que não requer manipulação pós-PCR, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados, e que pode ser aplicada na quantificação de genomas ou em estudos de expressão gênica (BELL & RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

A PCR quantitativa é muito útil para o diagnóstico de Leishmaniose canina e facilita o acompanhamento da carga parasitária durante e após o tratamento em amostras diferentes, permitindo a previsão dos retornos associados com o tecido, carga de parasita residual após o

tratamento (FRANCINO et al, 2006; MANNA et al, 2007; SOLANO - GALLEGO et al, 2007).

2.7. Prevenção e controle

As medidas de controle da leishmaniose visceral numa determinada área pressupõem o conhecimento da epidemiologia da doença na região a ser controlada. Deve-se ter em consideração os fatores que podem aumentar ou diminuir a prevalência da doença, como por exemplo: diagnóstico tardio, imigração de casos, número de pessoas susceptíveis, taxas de letalidade e aumento de incidência de novos casos (VERONESI & FOCACCIA, 2002).

Alencar (1961) propôs um modelo de profilaxia da LV, levando em conta as condições climáticas e condições sócio-econômicas em geral, com meios básicos de profilaxia como a descoberta e tratamento dos casos humanos; descoberta e eliminação dos casos caninos e de raposas infectadas e a luta contra o vetor (flebótomo).

O ministério da saúde usa como medidas preventivas um modelo dirigido à população humana com proteção individual (ex.: uso de telagem em portas e janelas, uso de repelentes, etc.); dirigidos ao vetor com o saneamento ambiental, através da limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, a fim de alterar as condições do meio. Usa ainda como medida o controle da população canina errante, doação de cães, vacina antileishmaniose visceral canina, o uso de telas em canis e coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% (BRASIL, 2006).

De acordo com Melo (2006) a vacina seria a melhor opção, por ser uma medida profilática, se todos os cães fossem vacinados. Segundo o mesmo autor os melhores resultados na queda de incidência ocorrem quando a análise é feita com tratamento por inceticida já que tem elevado impacto na sobrevivência do vetor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

Os 16 cães assintomáticos foram provenientes do Centro de Zoonoses de Caicó/RN, selecionadas em inquérito epidemiológico no município, e 2 (dois) sintomáticos que foram atendidos no Hospital Veterinário da UFCG (figura 9). Os cães foram inicialmente diagnosticados pelo ensaio imunoenzimático ELISA S7®² e confirmados parasitologicamente em pelo menos um dos seguintes exames: cultura de medula óssea e baço, esfregaço de medula óssea e *imprint* de pele, linfonodo poplíteo, fígado e baço.



Figura 9: cão com alopecia.
Fonte: Luiz Trevisan



Figura 10: cão com esplenomegalia.
Fonte: Luiz Trevisan

² Biogene Ind. & Comércio ME

Para a coleta de sangue venoso, realização do *swab* conjuntival e retirada de medula óssea (figura 11), os animais foram inicialmente sedados com quetamina + xilazina (0,5 mg/kg a 10% + 10 mg/kg a 10% IM) e em seguida sacrificados por aprofundamento anestésico com tiopental sódico (12,5 mg/kg IC a 2,5%), como preconizado pelo Ministério da Saúde. Os fragmentos de fígado, baço (figura 12) e linfonodo poplíteo obtidos durante a necropsia foram acondicionados em tubo de 1,5 mL e congelados até a realização dos testes.



Figura 11: coleta de medula óssea na tíbia.
Fonte: Luiz Trevisan



Figura 12: coleta do baço.
Fonte: Luiz Trevisan

3.2. Local de execução

Todas as amostras foram testadas no Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido do CSTR/UFCG.

3.3. *Leishmania chagasi*

Os parasitos utilizados como controle positivo foram isolados no município de Patos/PB de medula óssea de cães infectados naturalmente, mantidos em crescimento em meio bifásico NNN/LIT e congelados a -20°C em 25% de glicerina.

3.4. Protocolos de extração de DNA

Sangue venoso total, *swab* conjuntival, medula óssea, fígado, baço e linfonodo poplíteo foram submetidos à extração de DNA seguindo as técnicas do isopropanol (AUSUBEL et al. 2002), sílica (descrita pelo *Australian Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation/CSIRO*, Austrália) e por kits comerciais de acordo com o protocolo descrito pelos fabricantes^{3 4}.

3.5. Técnica de extração pela sílica

1. Para **SANGUE**, centrifugar 100 µL de sangue e o lavar 2X com 1 mL de PBS 1X pH 7.4. Adicionar 200 µL de tampão de lise (100 mM TrisHCl pH 8, 5 mM de EDTA pH 8, 200 mM de NaCl e 2% SDS), 4 µL de proteinase K (do estoque 10 mg/mL). Seguir a partir do passo 3. **OBS:** para medula óssea, acrescentar 10 µL de medula com anticoagulante.
2. Para os fragmentos de 2 mm de cada **TECIDO**, adicionar 200 µL tampão de lise (100 mM TrisHCl pH 8, 5 mM de EDTA pH 8, 200 mM de NaCl e 2% SDS), 4 µL de proteinase K (do estoque 10 mg/mL). **OBS:** para Swab, acrescentar 400 µL do tampão de lise e 8 µL de proteinase k;
3. Incubar em banho-maria à 56°C até completa dissolução do tecido;
4. Acrescentar 40 µL de acetato de potássio e homogenizar;
5. MAnter em gelo por 4 minutos;
6. Centrifugar, recolher o sobrenadante para um microtubo de 1,5 mL;
7. Adicionar 240 µL de solução ligadora de DNA (10% w/v de sílica, 3 M de tiocianato de guanidina, pH 6 - 6.5);
8. Misturar o material por inversão por 5 minutos;
9. Peletar a sílica por centrifugação a 12000g por 2 min e lavar duas vezes com 1 mL de etanol 70% gelado. Inverter o tubo para homogeneizar da sílica e o etanol em todas as lavagens.
10. Eluir o DNA com 200 µL de tampão de eluição (10mM de Tris pH8), homogeneizar, e centrifugar as amostras por 1 minuto a 8000 rpm ($\geq 6000 \times g$).

³ DNeasy® Blood & Tissue Kit Qiagen

⁴ Invisorb Spin Tissue Mini Kit®

11. Remover o sobrenadante, contendo o DNA, para um outro tubo.
12. O DNA foi estocado a -20°C até a realização do PCR.

3.6. Técnica de extração pelo isopropanol

A técnica de extração por isopropanol seguiu o protocolo descrito por Ausubel et al, (2002), antecedido pela digestão enzimática usando o tampão de lise e proteinase K como descrito no protocolo de extração pela sílica.

3.7. Dosagem de DNA

Logo após a extração, as amostras foram analisadas em fotômetro⁵ para verificação da concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) e para determinação do grau de pureza através do coeficiente $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$.

De acordo com o protocolo do kit, a extração de DNA de tecido deve ser realizada com um fragmento de cúbico de 2 mm, com peso aproximado de 10 a 15 mg. Em um fragmento de 25 mg de fígado e de 10 mg de baço se obtêm, respectivamente, de 10 a 30 μg e de 5 a 30 μg de DNA. Para 100 μL de sangue de mamífero é obtido de 4-5 μg de DNA de cão.

3.8. Procedimento da PCR

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de *Leishmania chagasi* pelas técnicas citadas acima e como controle negativo foi substituído o DNA por água ultra pura.

Para a reação de amplificação do DNA foram utilizados os seguintes reagentes: tampão 10X, 20mM de dNTP, 20 μM de cada iniciador (LK1 e LK2), 2U de taq polimerase e 5 μL de DNA (diluído 1/10) de cada amostra e água ultra-pura para volume final de 20 μL . Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos por Lambson et al., (1999) que amplificam sequências de minicírculo de *Leishmania chagasi* (E: 5' - CCA GTT TCC CGC CCC G - 3'; F: 5' - GGG GTT GGT GTA AAA TAG G - 3')

⁵ BioPhotometer plus Eppendorf

O ciclo de termociclagem foi constituído por uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, sucedidos de uma extensão final por 10 minutos.

Após a termociclagem, 5µL de cada reação foi adicionada a 1 µL de Blue green Loading dye I⁶ e em sequência aplicados em gel de agarose a 1,2 % e submetidos à eletroforese em cuba horizontal e tampão TBE 0,5 X (Tris base 1M, ácido bórico anidro 1M e EDTA sódico di-hidratado 20 mM). Após a corrida as bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas.

3.9. Análise estatística

Análise realizada pelo Programa SAS (1999) sendo avaliado a comparação das médias pelo Teste de Tukey, com significância de 95%.

⁶ LGC Biotecnologia

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de DNA por cada técnica em cada tecido está representada na tabela 1 e os valores médio, máximo, mínimo e desvio padrão estão representados graficamente nas figuras 13, 14, 15 e 16. De acordo com os resultados da tabela 1, o kit teve o melhor desempenho quando comparado às demais técnicas, seguido da técnica do isopropanol, que também resultou em valores médios de concentração próximo ou acima de 10 µg/ml para cinco dos seis tecidos ensaiados. Em média, a sílica apresentou o pior desempenho, com menores concentrações finais de DNA nas amostras.

Como pode ser observado nas figuras 14 a 15, houve uma grande variação no rendimento de extração em todos os métodos empregados, que pode refletir a variação na quantidade de material de cada amostra ou ainda na celularidade relativa delas.

Tabela 1: Concentração de DNA (µg/mL) de tecido de cão extraído com kit comercial, isopropanol e sílica, medida por fotometria.

Técnica	Tecidos					
	Baço	Fígado	Poplíteo	Sangue	Medula	Swab
Kit	134,32 ^A	181,92 ^A	163,02 ^A	24,15 ^A	12,1 ^B	22,26 ^A
Isopropanol	57,98 ^B	16,43 ^B	79,68 ^B	17,51 ^A	4,76 ^{AB}	9,26 ^{AB}
Sílica	26,67 ^B	12,79 ^B	3,24 ^C	2,38 ^B	10,76 ^B	3,35 ^B

A, B e C: letras iguais na mesma coluna não há diferença significativa ($P < 0,05$).

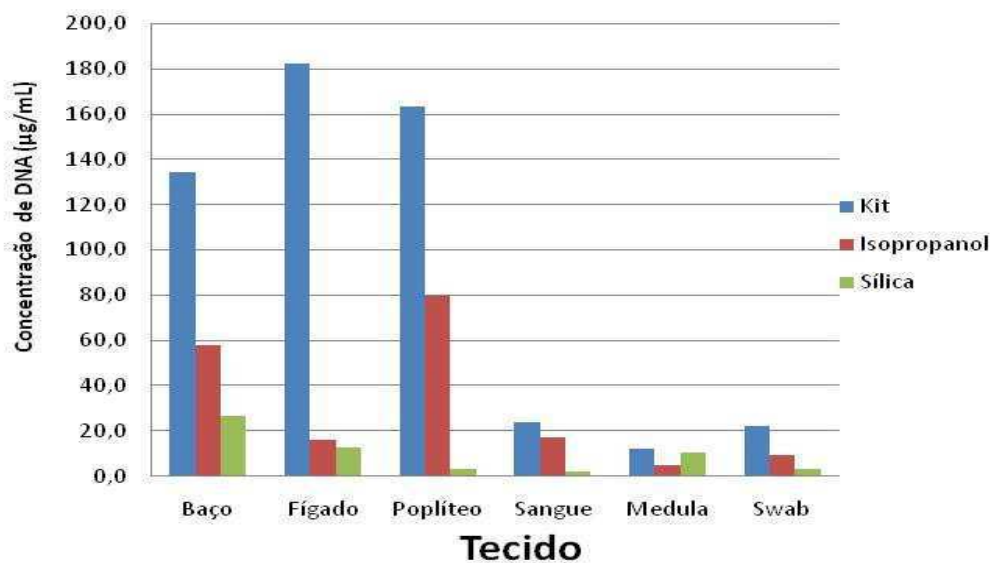


Figura 13: Concentração média de DNA ($\mu\text{g/mL}$) obtida na extração de baço, fígado, poplíteo, sangue e medula óssea utilizando kit comercial ou as técnicas de isopropanol e sílica.

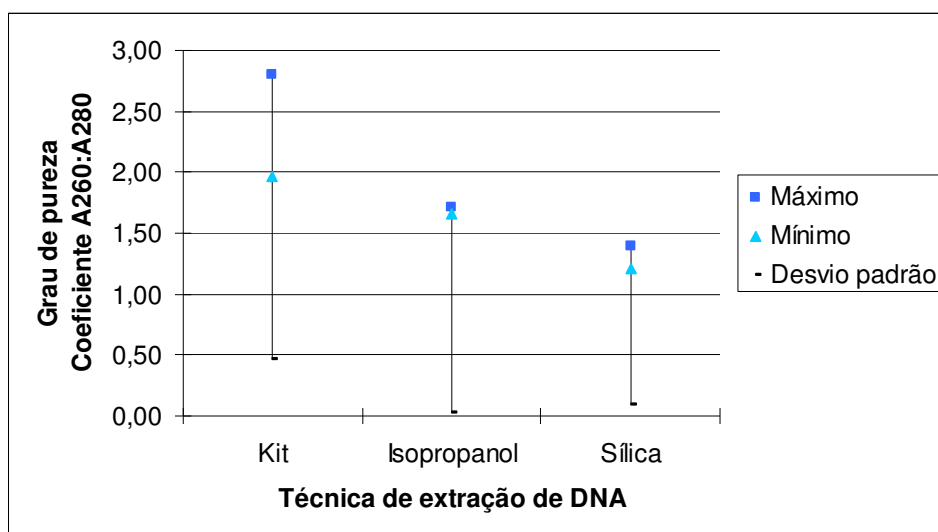


Figura 14: Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em $\mu\text{g/mL}$ obtidas nas extrações de tecidos com kit comercial.

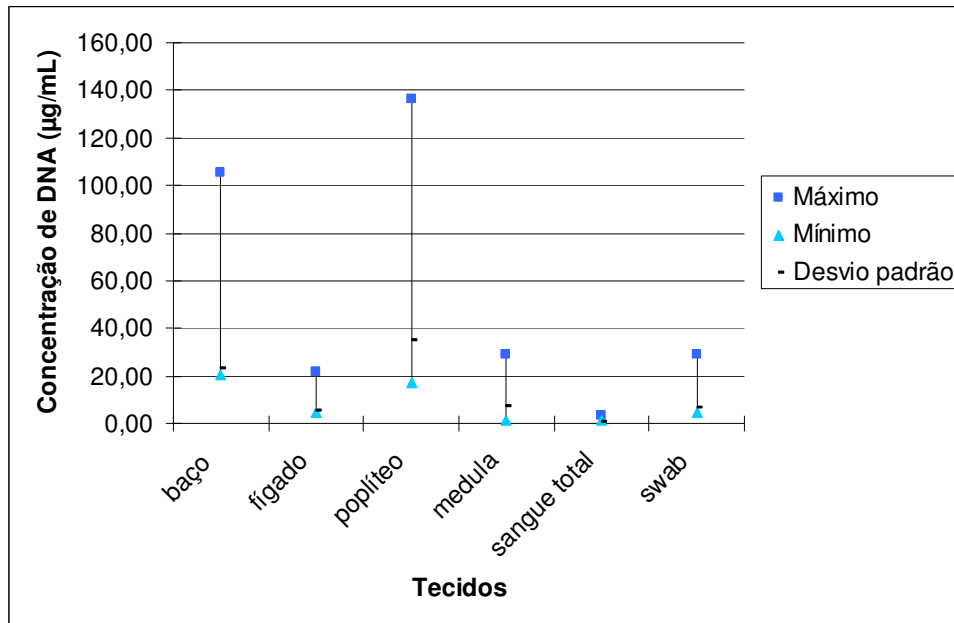


Figura 15: Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em µg/mL obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de isopropanol.

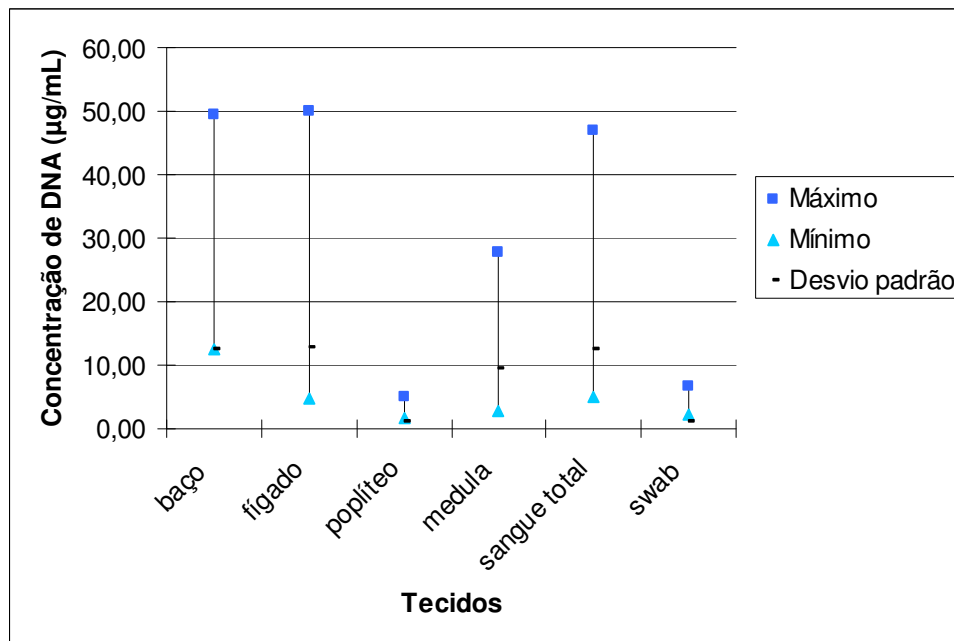


Figura 16: Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA em µg/mL obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de sílica.

Em relação ao grau de pureza, as médias estão apresentadas na tabela 2 e os valores médio, máximo, mínimo e desvio padrão estão representados graficamente nas figuras 17, 18 e 19. De acordo com Held (2009), baseado na relação A260/A280, preparações puras de DNA e RNA devem ter uma absorvância esperada $>1,8$ e $<2,0$, respectivamente. Em valores abaixo de 1,8, há contaminação por proteínas, como validado por Glasel (1995). De acordo com a tabela 2, a técnica do isopropanol foi a que obteve o melhor grau médio de pureza. A pureza obtida pelo kit foi inferior provavelmente devido à extração de uma quantidade excessiva de material, o que pode ser constatado pelos elevados rendimentos, muito acima do preconizado pelo fabricante do kit ($10 \mu\text{g/mL}$). O baixo grau de pureza do DNA de algumas amostras reflete-se em rastros no gel de agarose dos produtos de PCR, como indicado na figura 22.

Tabela 2: Valores médios do grau de pureza do DNA de tecidos de cão extraído com kit comercial, pelas técnicas do isopropanol e da sílica e medido por fotometria.

Tecidos						
Técnica	Baço	Fígado	Poplíteo	Sangue	Medula	Swab
Kit	1,79 ^A	1,93 ^{AB}	2,10 ^A	1,50 ^B	1,29 ^B	1,57 ^B
Isopropanol	1,80 ^A	2,89 ^A	1,73 ^B	2,16 ^A	2,19 ^A	2,24 ^A
Sílica	1,24 ^B	1,28 ^B	1,57 ^B	1,48 ^B	1,28 ^B	1,36 ^B

A, B: letras iguais na mesma coluna não há diferença significativa ($P < 0,05$).

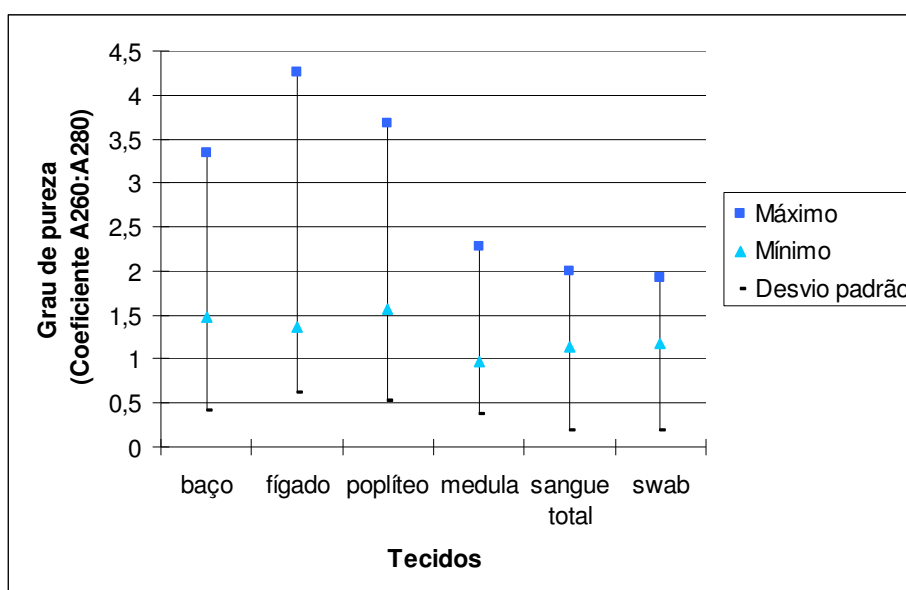


Figura 17: Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA da extração com kit comercial.

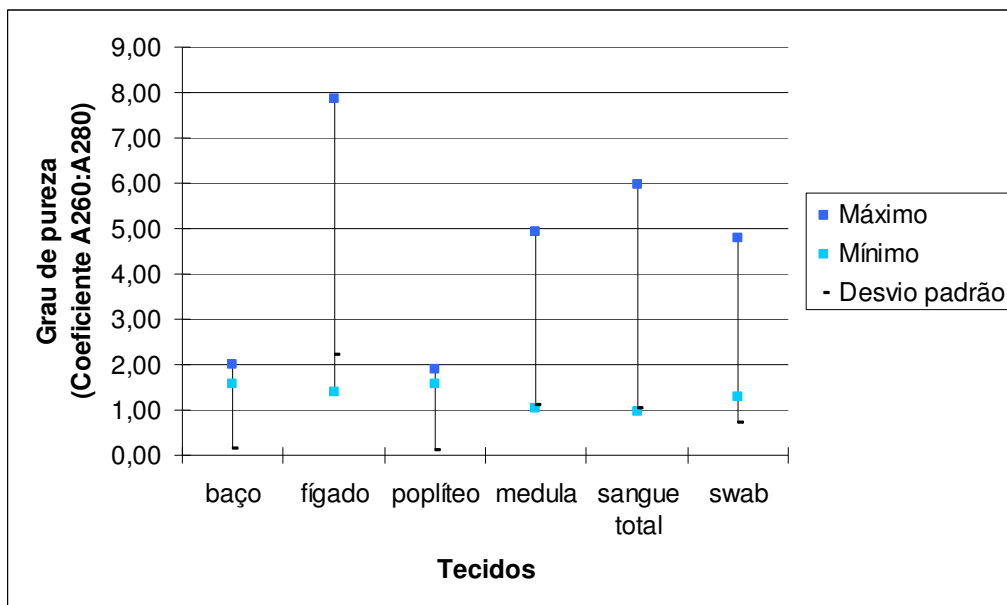


Figura 18: Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA da extração com a técnica de isopropanol.

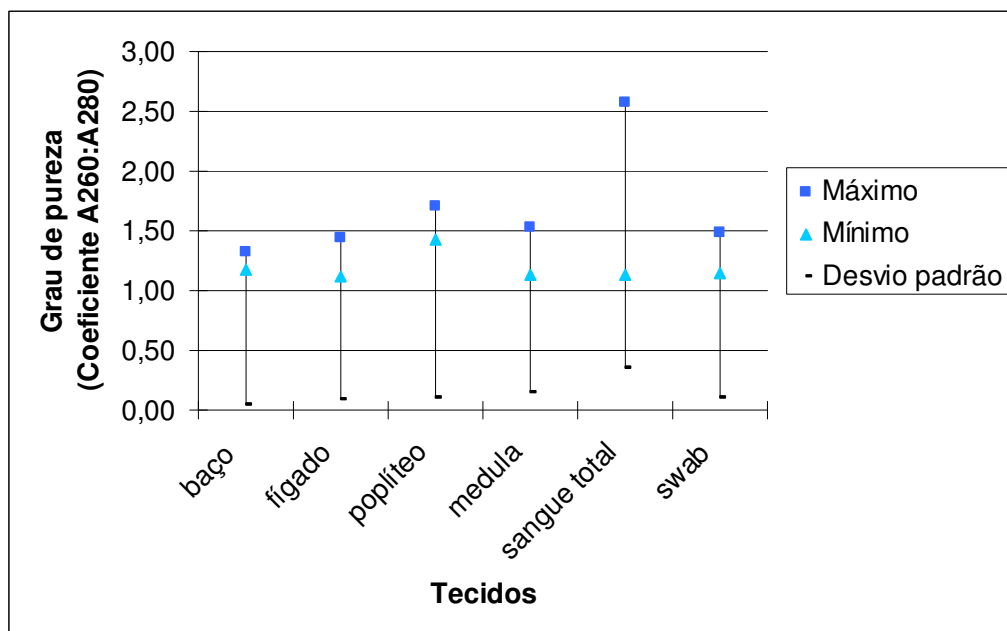


Figura 19: Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) de DNA extraído com a técnica de sílica.

Como controle do ensaio, foi realizado a extração de DNA de *Leishmania chagasi* proveniente de cultura em meio bifásico NNN/LIT. Aproximadamente 10^5 leishmanias foram submetidas à extração de DNA pelas três técnicas. De acordo com as tabelas 3 e 4, apesar da maior quantidade e a melhor qualidade de DNA terem sido obtidos com o kit comercial, não houve diferença significativa em relação ao isopropanol. Entretanto, a quantidade foi inversamente proporcional à pureza (figuras 20 e 21).

Os resultados apresentados aqui mostram que para células isoladas o kit teve melhor desempenho, com um bom rendimento e elevado grau de pureza. Já para a extração de tecidos a pureza de DNA extraído pelo kit foi inferior ao esperado, talvez por problemas associados à solubilização do material.

Tabela 3. Médias da concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de *Leishmania chagasi*, proveniente de cultura de promastigotas, extraído com kit comercial e com as técnicas do isopropanol e da sílica.

Técnica	$\mu\text{g/mL}$
Kit	17,90 ^A
Isopropanol	10,86 ^{AB}
Sílica	8,50 ^B

A, B: letras iguais não há diferença significativa.

Tabela 4. Médias do grau de pureza do DNA de *Leishmania chagasi*, proveniente de cultura de promastigotas, extraído com kit comercial e pelas técnicas do isopropanol e da sílica.

Técnica	$\mu\text{g/mL}$
Kit	2.27 ^A
Isopropanol	1.68 ^{AB}
Sílica	1.28 ^B

A, B: letras iguais não há diferença significativa.

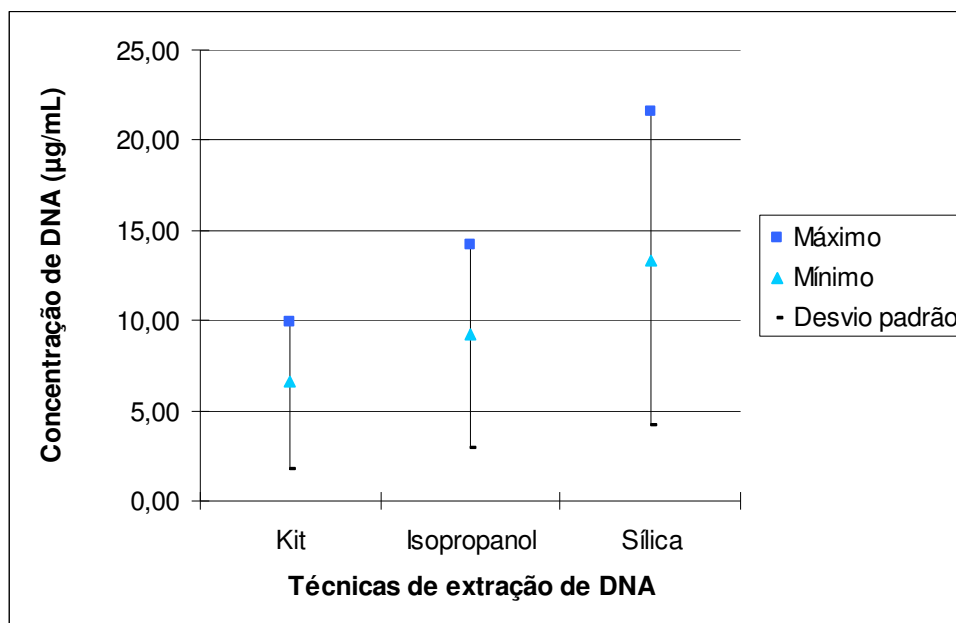


Figura 20: Concentrações (máxima, mínima e desvio padrão) de DNA de *Leishmania chagasi* extraído pelas técnicas do kit comercial, do isopropanol e da sílica.

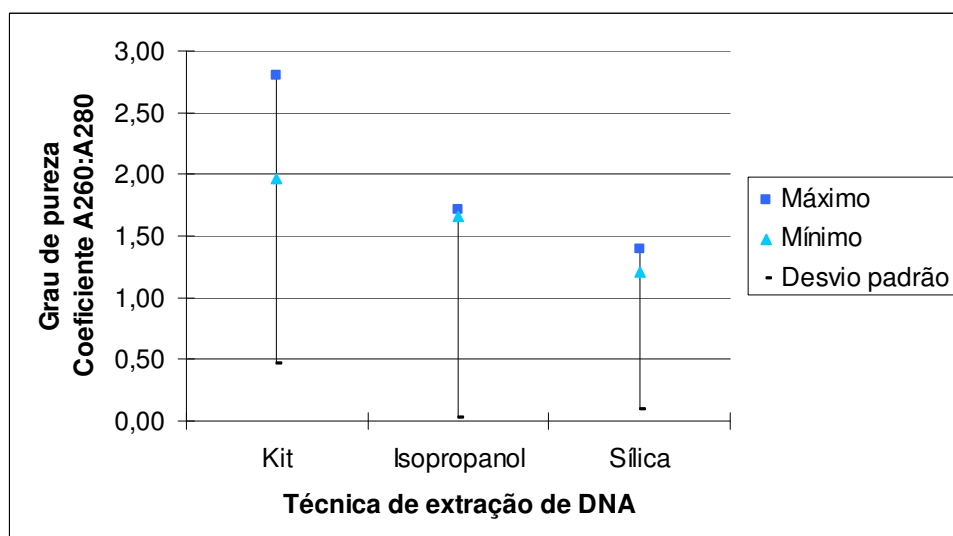


Figura 21: Grau de pureza (máximo, mínimo e desvio padrão) do DNA de *Leishmania chagasi* extraído pelas técnicas do kit comercial, do isopropanol e da sílica.

Independente do grau de pureza e da concentração de DNA, todas as amostras foram submetidas à PCR. Não houve resultado positivo na PCR de sangue, medula óssea e swab de conjuntiva em nenhuma das três técnicas de extração de DNA (foto não exibida), não corroborando com os resultados de Moshfe et al (2009), Solano-Gallego et al (2009) e

Ferreira et al (2008), respectivamente. De uma forma geral, para estes tecidos, e nas três técnicas, não houve uma boa extração de DNA, além do grau de pureza indicar uma alta porcentagem de proteína.

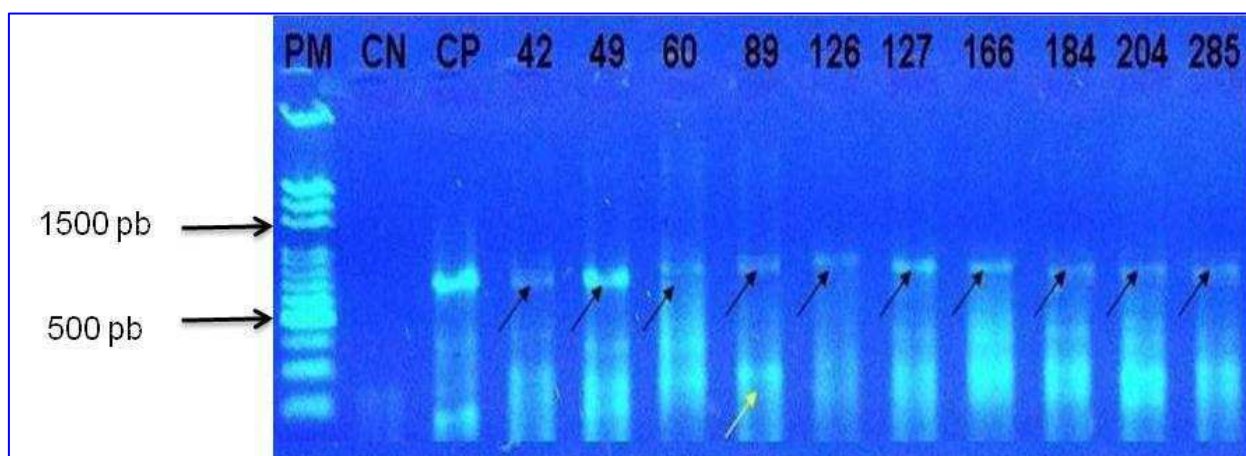
Comparando com a eficiência observada por outros autores para sangue e medula, esta diferença pode ter sido favorecida por terem utilizado coágulo, ao invés de sangue, e um volume maior da amostra de medula, respectivamente (LACHAUD et al, 2001; SOLANO-GALLEGO et al, 2009). Neste experimento, o kit utilizado preconiza o uso de 50 a 100 µL de sangue contendo hemácias não nucleadas e de 5 a 10 µL para nucleadas. Pelas características das células da medula óssea, foi utilizado volume de 10 µL na extração. Outra justificativa é a baixa disseminação hematogênica da *Leishmania*, uma vez que 16 dos 18 cães analisados eram assintomáticos, como também observado por Solano-Gallego et al (2009). Para o swab de conjuntiva, o aumento da frequência de positivos foi obtido por Ferreira et al (2008) em função do uso de técnica de hibridização, além de terem utilizado apenas animais sintomáticos.

Na PCR do linfonodo poplíteo, baço e fígado obteve-se positividade de 72,2; 66,67 e 66,67%, respectivamente (Tabela 5 e Figura 22), quando a extração foi realizada com o kit comercial. Nas três técnicas, a maior positividade também foi observada nas amostras do linfonodo poplíteo. Estes resultados concordam com os obtidos por Maia et al (2009) que afirmam que a PCR de linfonodo é a melhor opção como diagnóstico primário, seguido da PCR da medula óssea quando não há linfadenopatia, uma vez que a punção de baço é um método muito invasivo e sujeito à hemorragia. Quando os animais foram avaliados quanto à positividade em pelo menos uma das técnicas, a sensibilidade máxima da PCR foi de 88,88% utilizando-se o kit comercial; em apenas dois animais não houve amplificação no baço, fígado e linfonodo poplíteo. Este resultado é semelhante ao obtido por Andrade et al (2006) em pele (87,2%), baço (84,6%) e fígado (80,0%), com sensibilidade maior no grupo de cães sintomáticos, e bem superior ao obtido por Moshfe et al (2009) que foi de 53,9% e 43,4% em animais sintomáticos e assintomáticos, respectivamente. Os resultados também corroboram com o estudo realizado por Troncarelli (2008), que verificou em 100 cães do município de Bauru-SP, resultados positivos em amostras de fígado (76%) e baço (72%).

Entretanto, em estudo realizado por Soares et al (2005), avaliando amostras de baço, fígado ou linfonodo, em 15 cães soropositivos assintomáticos, verificaram apenas 13,33% de positividade.

Tabela 5. Resultado da PCR das amostras de linfonodo poplíteo, baço e fígado em relação aos três protocolos de extração de DNA.

Técnica	Kit		Isopropanol		Sílica	
Poplíteo	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	5	27,78	13	72,22	14	77,78
Positivo	13	72,22	5	27,78	4	22,22
Baço	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	6	33,33	15	88,33	17	94,44
Positivo	12	66,67	3	16,67	1	5,56
Fígado	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	6	33,33	15	88,33	17	94,44
Positivo	12	66,67	3	16,67	1	5,56



PM: Peso molecular; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; seta preta: banda positiva; seta amarela: prováveis rastros de RNA; números: identificação das amostras.

Figura 22. Resultado da PCR de baço com DNA extraído com kit comercial.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que a melhor associação de técnicas para o diagnóstico do calazar canino pela PCR inclui o uso de linfonodo poplíteo como fonte de DNA, o emprego de kits comerciais de extração quando a finalidade for extrair uma boa concentração de DNA e o emprego da técnica de extração pelo isopropanol quando a finalidade for conseguir um bom grau de pureza de DNA. Nas extrações com kits comerciais, a sensibilidade da PCR alcançou 72% numa amostra em que 88% dos cães eram assintomáticos.

6. REFERÊNCIAS

ALENCAR, J.E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do instituto de Medicina tropical**, São Paulo, v.3, n.4, p.175-180, jul/ago, 1961.

ALVAR, J., et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1–88, 2004

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**. v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

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. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ANDRADE, H. M., et al. Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231–238, 2006.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D. et al. **Short protocols in molecular biology**. 5 ed., Wiley; 2002.

BANETH, G., AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**. v.175, p.14–15, 2008.

BARKER, D.C., DE BRUIJN, M.H.L., ERESH, S., SMYTH, A. Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sandflies and cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86 supl.1, p. 73-74, 1991.

BARROUIN-MELO, S., 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**. Rio de Janeiro, v.99, n.2, p.195-197, Mar. 2004.

BATISTA, M. G. N. **Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência, fatores de risco e isolamento do agente.** Patos, UFCG, 2008, 44p. (Especialização em Saúde Pública Animal).

BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology.** v.18, p.337-342, 2002.

BLACKBURN, K., et al. The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** v. 82, n. 6 , p. 613-629, 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Editora M. S. Brasília – DF, 2006.

CAMPINO, L., et al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. **Veterinary Parasitology.** v. 92, n.4, p.269-75, 2000.

CAMPINO, L., 2002. Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In: Farrel, J.P. (Ed.), **World Class Parasites Leishmania** :Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, v. 4, p. 45–57.

COSTA, J. M. L., et al. Visceral Leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: Evolution of an Epidemic. **Cadernos de Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 321-324, apr/jun. 1995.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.34, n.2, p.223-228, mar/abr. 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital.** Rio de Janeiro, v.45, n.4, p. 45-47, abr. 1954.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral neotrópica. **O Hospital**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 315-321, fev. 1938.

DEANE, M.P.; DEANE, L. M. Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donavani*, em um foco de calazar, no Ceará. **O Hospital**. Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 35-40, jun.1954.

DE BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**. v. 52, p. 45-58, 1992.

DEDET, J.P.; PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: COOK, G.C & Zumla A. **Manson's Tropical Diseases**. London: WB Saunders Company Ltd, , 21 ed., 2003. 1341-1367.

DOURADO, Z. F., et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral e o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**. v. 36, n.3, p.205-214, set/dez. 2007.

EGLUND, P.T., et al. Kinetoplast DNA: struture and replication. In: **Molecular Biology of Parasitic Protozoa**. SMITH, D. F.; PARSONS, M. London : Oxford, 1996, p. 73-87

ELKHOURY, A. N.S.M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en Las Américas, Brasília, 2005. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis en las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la salud, 2006, p. 24-26.

FARREL, J.P. Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In: Farrel, J.P. (Ed.), **World Class Parasites Leishmania** :Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, v. 4, p. 45–57, 2002

FERREIRA, S., et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veteterinary Parasitology**. v. 152, p. 257-263, 2008.

FRANÇA-SILVA, J. C. **Leishmaniose Visceral Canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.** 1997. 132 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

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

GIUNCHETTI, R. C., et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology.** v.121, n.1-2, p.23-33, 2008.

GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280nm absorbance ratios. **Circle Reader Service,** v. 18, n. 1, 1995. Disponível em: <<http://www.colorado.edu/chem/chem4761/biolab2000/A260%20Absorption%20%20Glasl.pdf>> Acesso em: 30 jun. 2009.

GONTIJO, C; MELO, M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.

HARITH, A. E., et al. Application of a Direct Agglutination Test for Detection of Specific Anti-Leishmania Antibodies in the Canine Reservoir. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 27, n. 10, p. 2252-2257, 1989.

HELD, P. G. The nucleic acid "A260/A280" ratio measurment. Disponível em: <<http://www.mnstate.edu/chastain/BCBT%202008%20website/Introduction%20280-260.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2009.

JESUS, A.D., et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina. Disponível em: < <http://www.unidesc.com/download.php?codigoArquivo=66>>. Acesso em: 26 set. 2009.

- LACHAUD, L., et al. Comparison of Six PCR Methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 1, p. 210–215, 2001.
- LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 101, p. 229-232, 1999.
- LOGAN, J.M.J., EDWARDS, K.J., SAUNDERS, N.A., STANLEY, J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.2227–2232, 2001.
- LUKES, J., et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.
- LUZ, Z.M.P., et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.34, n.3, p.249-254, 2001.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**. v. 158, p. 274–287, 2008.
- MAIA, C., RAMADA, J., CRISTÓVÃO, J., CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**. v. 179, n. 1, , p. 142-144, 2009.
- MANCIANTI F, MECIANI N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **American of Journal Veterinary Reserch**. v. 8, n. 49, p. 1409-11, 1988.
- MANNA, L., et al. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. **Veterinary Journal**. v.177, p.279–282, 2007.

MELO, Marcia Almeida. **Isolamento de Clones Imunoreativos e Caracterização *in silico* de novos antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

MEREDITH, S. E. O., et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n. 7, p. 1742–1745, 1995.

METTLER, M., et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, na immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmania infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. n. 11, vol. 43, p. 5515–5519, 2005

MILES, M.A., *et al.* Canine Leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL FORUM OF THE CANINE LEISHMANIASIS. Barcelona. *Proceedings...* Wiesbaden, Hoechst Roussel Vet., p. 46-53, 1999.

MOHEBALI ,M.; TARAN, M. ; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. v.26, n. 121(3-4), p. 239-45, 2004.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F. 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.

MOSHFE, A., et al. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropical**. (2009),
doi:10.1016/j.actatropica.2009.07.004

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**. v. 262, p.56-65, 1990.

NICOLAS, L., MILON, G., PRINA, E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by Light Cycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. **Journal of Microbiological Methods** v.51, p.295–299, 2002.

OLIVA, G., et al. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1318–1322, 2006.

PEACOCK et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**. v.39, n.7, jul. 2007.

ROLÃO, N. M. C. J. **O parasitismo e a resposta imunitária local em murganhos BALB/c infectados por *Leishmania infantum***. 2004. 183 f. Tese. (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2004.

ROSÁRIO, E.Y., 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.

SAIKI, R.K., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v.239, p.487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. A laboratory manual. 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; SHLOMAI, J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings. Biological sciences*. The Royal Society, v. 245, n. 1313, p. 121-126, 1991.

SETÚBAL, S. **Calazar**. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Faculdade de Medicina da UFF. Disponível em:

<<http://labutes.vilabol.uol.com.br/calazar.htm>> Acesso em: 27 setembro 2009.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupalia: Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 79, n.4, p.511, out/dez. 1984.

SILVA, E. S., et al Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biology and Disease**. v.14, 4:4, jun 2005.

SILVA, S. S., et al. Leishmaniose visceral canina: estudo clinico-epidemiológico e diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 23, n. 3, 2001

SIMPSON, L. Kintoplast DNA in Trypanosomid flagellates. **International Review of Cytology**. v. 99, p. 119-179, 1986.

SMYTH, A.J., et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**. V.105, p.183-192, 1992.

SOARES M. J. V.; MORAES J. R. E. ; ROSELINO A. M. F. Polymerase chain reaction in detecting leishmania sp in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.11, n.4, p.532-539, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L., et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v.147, p.315–319, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al., Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

STATISTICS ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **SAS User's guides**: statistics. North Caroline: SAS Institute Inc. 1999.

TAFURI W.L., et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunology Methods**. v. 292, n.1-2, p.17-23, 2004

TAVARES, C.A. P; FERNANDES A.P., MELO M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v.3, p.657-67, 2003.

TRONCARELLI, M. Z. **Infecção por *Leishmania* spp. e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica paraleishmaniose visceral canina**.2008. 133 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - São Paulo, 2008.

VERONESI R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 1254 –1275 p.

WELLER, M.G. Institute of Hydrochemistry, Technical University of Munich, München, Germany. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 366, n. 6-7, p. 635-45, 2000.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em:

<http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html>. Acesso em 14 set 2009.

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