



PRPG | Pré-Reitoria de Pós-Graduação  
PIBIC/CNPq/UFPG-2009

**DIAGNÓSTICO DO CALAZAR CANINO: TECIDO versus PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA.  
QUAL A MELHOR OPÇÃO?**

**Gilzane Dantas Nóbrega<sup>1</sup>, Kamila Nunes de Araújo<sup>2</sup>, Marcia Almeida de Melo<sup>3\*</sup>, Paulo Paes de Andrade<sup>4</sup>, Maria das Graças N. Batista<sup>5</sup>, Expedito K. A. Camboim<sup>6</sup>, Aline A. Cordeiro<sup>7</sup>, Adílio S. de Azevedo<sup>8</sup>**

**RESUMO**

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

**DIAGNOSTIC OF CANINE KALA-AZAR: TISSUE versus DNA EXTRACION METHOD.  
WHAT IS THE BEST OPTION?**

**ABSTRACT**

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

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária da Unid. Acad. de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: gil\_nobrega@hotmail.com

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária da Unid. Acad. de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: kamila\_vet@hotmail.com

<sup>3</sup> Professora adjunta da Unid. Acad. de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: marcia.melo@pq.cnpq.br; \*Autora para correspondências.

<sup>4</sup> Professor adjunto do Departamento de Genética da UFPE, E-mail: andrade@ufpe.br

<sup>5</sup> Médica Veterinária responsável pelo Centro de Zoonoses de Caicó – RN, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail:

<sup>6</sup> Aluno do Doutorado em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: expeditok@hotmail.com

<sup>7</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail:

<sup>8</sup> Aluno do Mestrado em Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: adílio\_vet@yahoo.com.br

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.

## INTRODUÇÃO

As leishmanias são protozoários digenéticos da família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), cujas espécies são todas parasitas de animais ou plantas. O gênero *Leishmania*, em conjunto com *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, é composto por espécies digenéticas parasitando vertebrados.

Na América, a leishmaniose visceral (LV) tem como agente etiológico a espécie *Leishmania (L.) chagasi*, distribuída desde o norte do México até o sul da Argentina. O principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae (LAINSON & RANGEL, 2005)

Em 1954, Deane & Deane descobrem que a transmissão é realizada pela *L. longipalpis* e que o reservatório silvestre é constituído por raposas *Lycalopex vetulus* (DEANE & DEANE, 1954b); posteriormente, conseguem infectar flebotomos alimentando-os em raposas infectadas (DEANE & DEANE, 1954c). O cão é o principal reservatório da *L. chagasi* e, sendo companhia constante do homem, favorece a dispersão da doença durante a migração humana através das áreas endêmicas.

No Brasil, a LV, também conhecida por calazar, tinha inicialmente um caráter eminentemente rural, mas, recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO). (BRASIL, 2006).

No Brasil, em 1956, Deane propôs como medidas de controle da leishmaniose visceral o tratamento dos casos humanos, o sacrifício dos cães infectados e a regular borrifação das casas com casos. Estas medidas ainda são adotadas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Várias técnicas podem ser usadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral, desde a identificação do parasito por cultura de aspirado de medula até o uso de técnicas moleculares; entretanto ainda há uma busca por ensaios de baixo custo, que apresentem um equilíbrio satisfatório entre sensibilidade e especificidade, distingam entre pacientes assintomáticos, com doença em progressão ou em fase de cura e que possam ser realizados em campo.

A identificação do parasita por exames diretos de aspirado de baço e medula óssea do paciente e as culturas foram os primeiros ensaios diagnósticos sendo ainda bastante utilizados na prática médica. O cultivo de aspirado de baço é mais eficiente (95%) na detecção do parasito do que quando a cultura é feita com amostras de medula óssea (54 a 86%) ou linfonodo (64%) (SIDDIG et al, 1988). Em condições ideais a cultura pode atingir elevados índices de positividade, sendo equivalente mesmo ao PCR (MATHIS & DEPLAZES, 1995); entretanto, a coleta é invasiva, causando desconforto e risco ao paciente, além de necessitar de um profissional extremamente capacitado para realização da mesma e demandar um longo tempo para a resposta. O exame direto de aspirados, por isso, ganha importância na prática médica, apesar de ser invasivo e ter baixa sensibilidade (PIARROUX et al., 1994; BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos são largamente empregados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), dada a complexidade antigênica do parasita, é sujeita a reações cruzadas com leishmaniose cutânea e com infecções causadas por outros tripanosomatídeos e micobactérias, por este motivo, a especificidade varia em torno de 80% e a sensibilidade entre 60 e 100%, dependendo do estado clínico do cão e das infecções comuns na região em estudo (MOHAMMED et al, 1986; DA COSTA et al, 1991; BOELAERT et al., 2004; METTLER et al., 2005). Além da RIFI, o Ministério da Saúde já tem padronizado um teste de ELISA, ambos utilizados para inquéritos de saúde pública. Em nível nacional, há apenas um teste de ELISA, produzido por uma empresa particular, que é autorizado pelo Ministério da Agricultura para diagnóstico do calazar canino.

As técnicas envolvendo biologia molecular, embora com elevado potencial diagnóstico, ainda não ganharam o mercado para as leishmanioses (BENSOUSSAN et al., 2006; SALOTRA & SINGH, 2005; MARY et al., 2004).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) é uma atrativa alternativa para o diagnóstico neste contexto e pode empregar amostras não invasivas ou pouco invasivas que tem grande importância porque são simples, indolores e trazem menor 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). 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-Galego et al (2001) encontraram 51% de positividade em pele, Andrade et al (2006) em pele e baço e Maia et al (2009) avaliam a melhor alternativa entre baço, linfonodo e medula óssea. 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 do 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).

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, trabalho teve por objetivo avaliar o melhor tecido e a técnica mais eficaz de extração de DNA para o diagnóstico desta enfermidade em cães.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 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. Os cães foram inicialmente diagnosticados pelo ensaio imunoenzimático ELISA S7<sup>9</sup> 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.

Para a coleta de sangue venoso, realização do *swab* conjuntival e retirada de medula óssea, 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 e linfonodo poplíteo obtidos durante a necropsia foram acondicionados em tubo de 1,5 mL e congelados até a realização dos testes.

### Local de execução

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

### *Leishmania chagasi*

Os parasitos utilizados com 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.

### 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<sup>10 11</sup>.

---

<sup>9</sup> Biogene Ind. & Comércio ME

<sup>10</sup> DNeasy® Blood & Tissue Kit Qiagen

<sup>11</sup> Invisorb Spin Tissue Mini Kit®

### 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.
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);
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 ( $\geq 6000 \times g$ ).
11. Remover o sobrenadante, contendo o DNA, para um outro tubo.
12. O DNA foi estocado a -20°C até a realização do PCR.

### 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.

### Dosagem de DNA

Logo após a extração, as amostras foram analisadas em fotômetro<sup>12</sup> para verificação concentração da DNA (µg/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.

### Procedimento do 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, 20µM de cada primer (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 primers 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')

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 seg, pareamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, 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 I<sup>13</sup> 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.

<sup>12</sup> BioPhotometer plus Eppendorf

<sup>13</sup> LGC Biotecnologia

## Análise estatística

Análise realizada pelo Programa SAS (1999) sendo os dados avaliados pelo teste de qui-quadrado e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, com significância de 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de DNA por cada técnica em cada tecido está representada na tabela 1 e os valores médios, máximos e mínimos representados graficamente na figuras 1, 2, 3 e 4. 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 2 a 4, houve uma variação grande 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 e medida por fotometria.

Técnicas	Tecidos						Média
	Baço	Fígado	Poplíteo	Sangue	Medula	Swab	
Kit	134,32 <sup>A</sup>	181,92 <sup>A</sup>	163,02 <sup>A</sup>	24,16 <sup>A</sup>	12,1 <sup>A</sup>	22,26 <sup>A</sup>	89,63
Isopropanol	57,98 <sup>B</sup>	16,43 <sup>B</sup>	79,68 <sup>B</sup>	17,52 <sup>A</sup>	4,76 <sup>B</sup>	9,26 <sup>AB</sup>	30,94
Sílica	26,67 <sup>B</sup>	12,79 <sup>B</sup>	3,24 <sup>C</sup>	2,38 <sup>B</sup>	10,76 <sup>AB</sup>	3,35 <sup>B</sup>	9,87

A, B e C: letras iguais na mesma coluna não há diferença significativa.

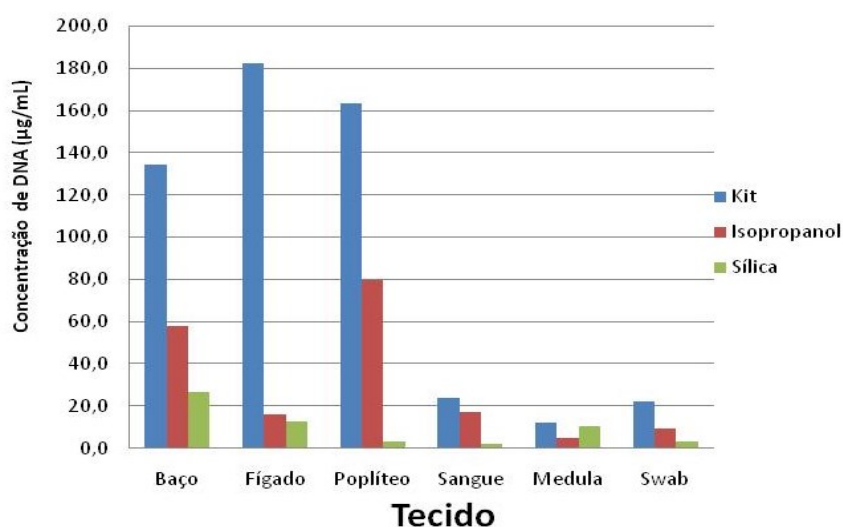


Figura 1: Concentração média de DNA (µg/mL) obtida na extração de baço, fígado, poplíteo, sangue e medula óssea utilizando kit comercial ou as técnicas de isopropanol e sílica.

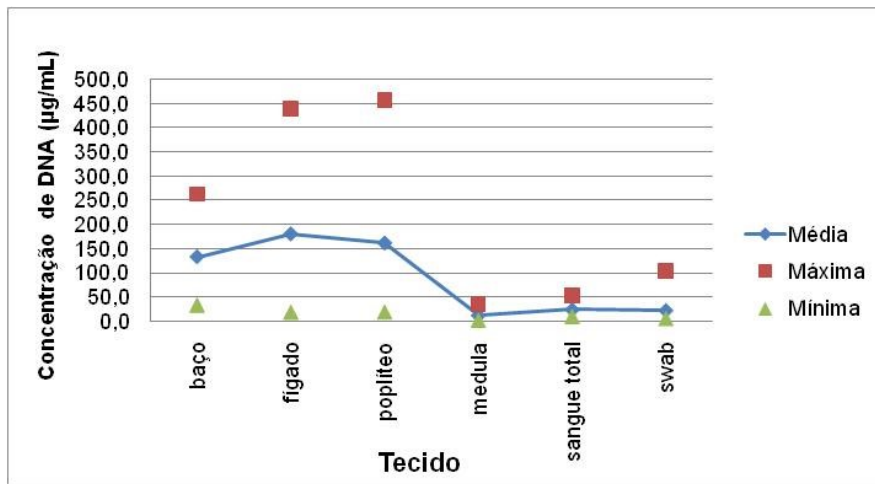


Figura 2: Concentrações média, máxima e mínima de DNA em  $\mu\text{g/mL}$  obtidas nas extrações de tecidos com kit comercial

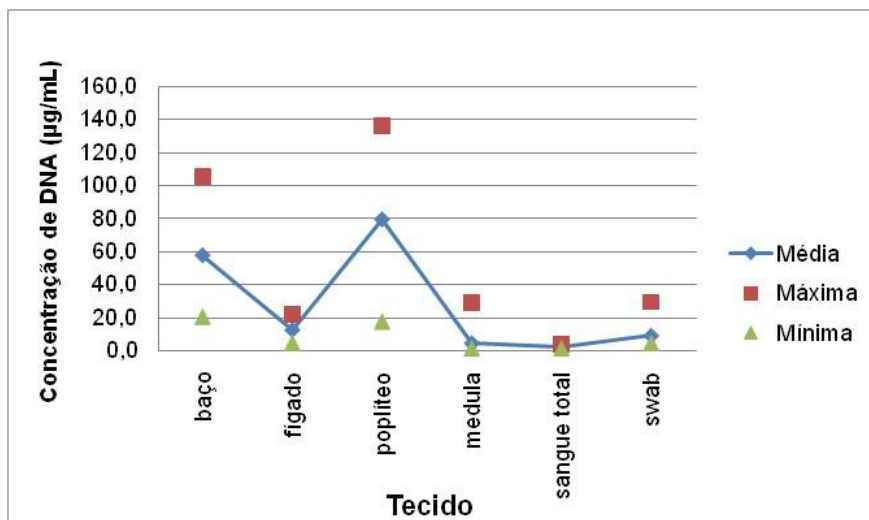


Figura 3: Concentrações média, máxima e mínima de DNA em  $\mu\text{g/mL}$  obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de isopropanol.

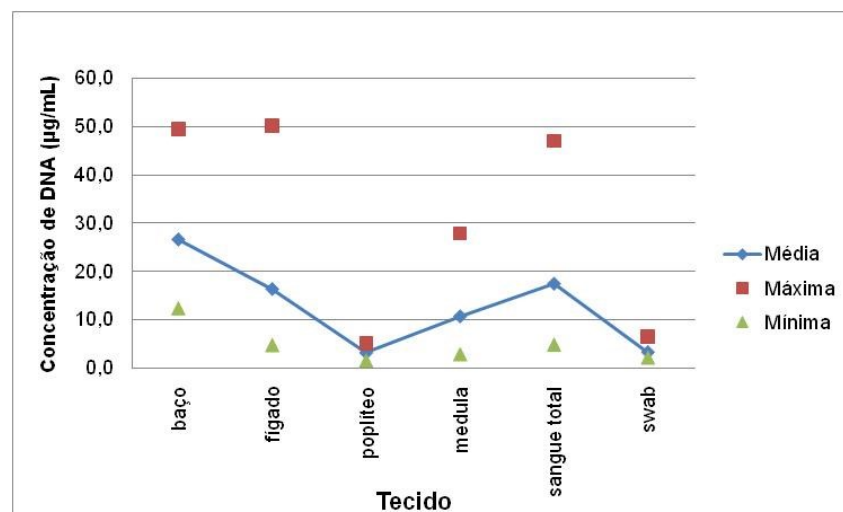


Figura 4: Concentrações média, máxima e mínima de DNA em µg/mL obtidas nas extrações de tecidos com a técnica de sílica.

Em relação ao grau de pureza, as médias estão apresentadas na tabela 2 e os valores médios, máximos e mínimos representados graficamente nas figuras 5, 6 e 7. 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 µg/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 10.

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.

Técnica	Tecidos						
	Baço	Fígado	Poplíteo	Sangue	Medula	Swab	Média
Kit	1,79 <sup>A</sup>	1,93 <sup>AB</sup>	2,10 <sup>A</sup>	1,50 <sup>B</sup>	1,29 <sup>B</sup>	1,57 <sup>B</sup>	1,7
Isopropanol	1,80 <sup>A</sup>	2,89 <sup>A</sup>	1,73 <sup>B</sup>	2,16 <sup>A</sup>	2,19 <sup>A</sup>	2,24 <sup>A</sup>	2,2
Sílica	1,24 <sup>B</sup>	1,28 <sup>B</sup>	1,57 <sup>B</sup>	1,48 <sup>B</sup>	1,28 <sup>B</sup>	1,36 <sup>B</sup>	1,4

A, B: letras iguais na mesma coluna não há diferença significativa.

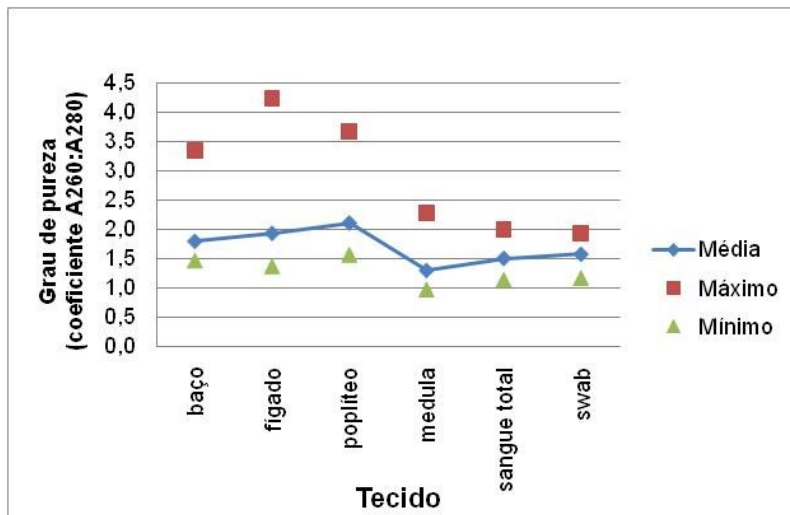


Figura 5: Grau de pureza do DNA da extração com kit comercial

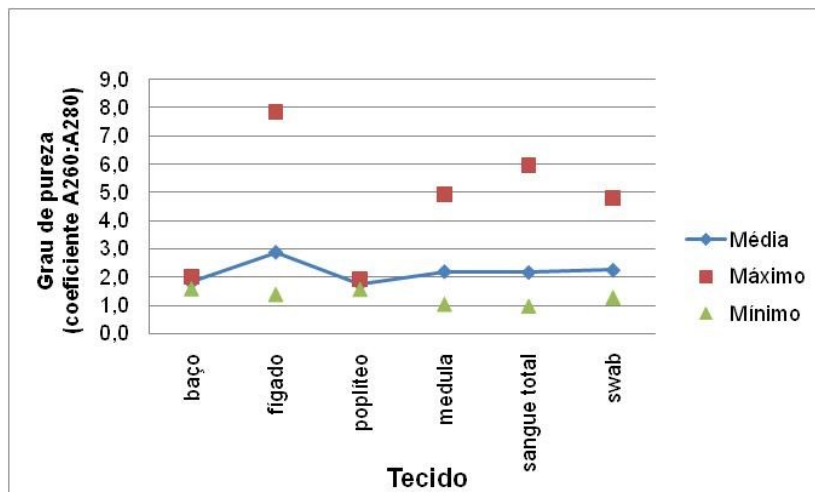


Figura 6: Grau de pureza de DNA da extração com a técnica de isopropanol

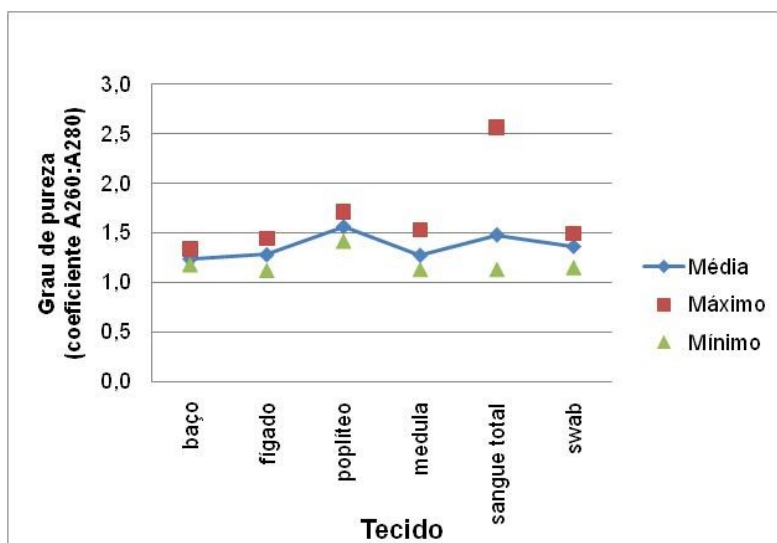


Figura 7: Grau de pureza de DNA extraído com a técnica de sílica



Como controle do ensaio, foi realizada 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 a sílica, não houve diferença significativa em relação ao isopropanol. Entretanto, a quantidade foi inversamente proporcional à pureza (figuras 8 e 9).

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	8.5 <sup>A</sup>
Isopropanol	10.86 <sup>AB</sup>
Sílica	17,9 <sup>B</sup>

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	$A_{260}/A_{280}$
Kit	2.270 <sup>A</sup>
Isopropanol	1.683 <sup>AB</sup>
Sílica	1.286 <sup>B</sup>

A, B: letras iguais não há diferença significativa.

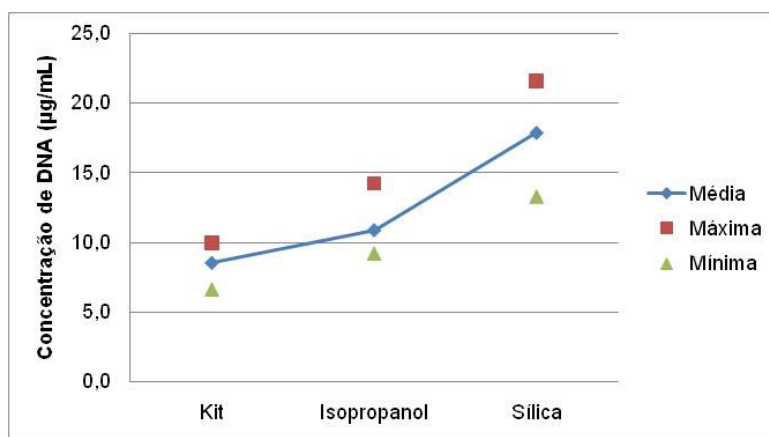


Figura 8: Concentrações médias, máximas e mínimas de DNA de *Leishmania chagasi* extraído com kit comercial e pelas técnicas do isopropanol e da sílica

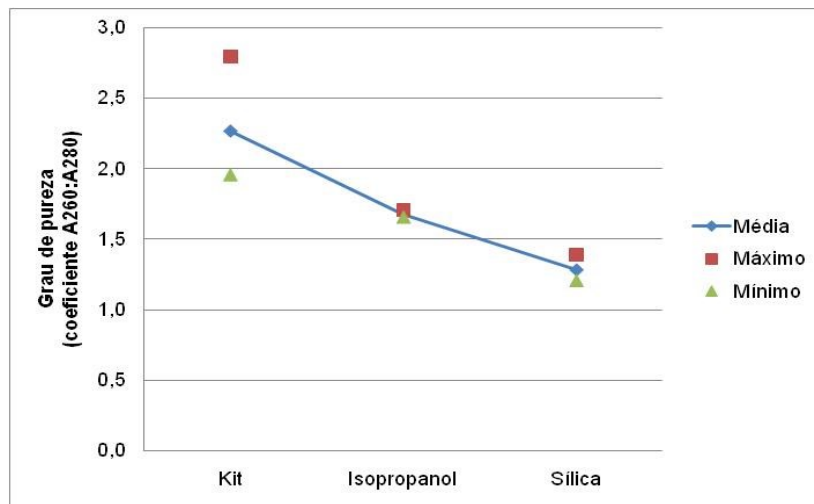


Figura 9: Médias, máximas e mínimas do grau de pureza do DNA de *Leishmania chagasi* extraído com kit comercial e pelas técnicas do isopropanol e da sílica

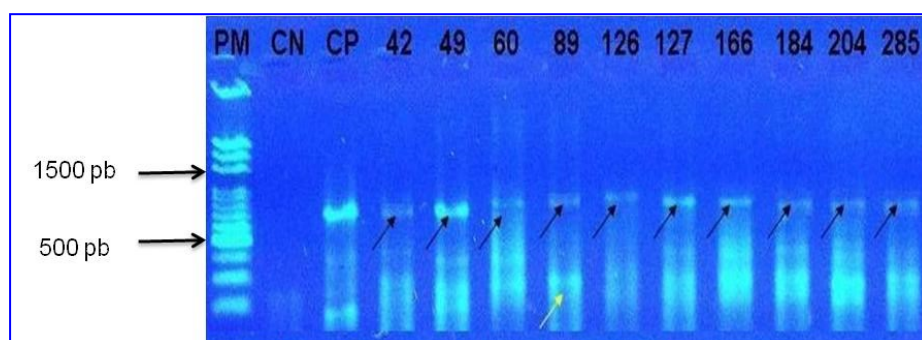
Independente do grau de pureza e da concentração de DNA, todas as amostras foram submetidas à PCR. Não houve resultado positivo na PCR de sangue, medula óssea e swab de conjuntiva em nenhuma das três técnicas de extração de DNA (foto não exibida), não corroborando com os resultados de Moshfe et al (2009), Solano-Galego et al (2001) 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-GALEGO et al, 2001). Neste experimento, o kit utilizado preconiza o uso de 50 a 100  $\mu$ L de sangue contendo hemácias não nucleadas e de 5 a 10  $\mu$ L para nucleadas. Pelas características das células da medula óssea, foi utilizado volume de 10  $\mu$ L 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-Galego et al (2001). 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 10), 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 a 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.

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	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Poplíteo</b>						
Negativo	5	27,78	13	72,22	14	77,78
Positivo	13	72,22	5	27,78	4	22,22
<b>Baço</b>						
Negativo	6	33,33	15	83,33	17	94,44
Positivo	12	66,67	3	16,67	1	5,56
<b>Fígado</b>						
Negativo	6	33,33	15	83,33	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 10. Resultado da PCR de baço com DNA extraído com kit comercial.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que a melhor associação de técnicas para o diagnóstico do calazar canino por PCR inclui o uso de 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.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa PIBIC;

Ao Centro de Zoonoses de Caicó/RN por ter permitido a utilização dos animais para o projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido do CSTR pelo apoio e a toda equipe que contribuiu com o desenvolvimento deste projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H. M. et al. Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol**, 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
- BENSOUSSAN, E.; et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p.1435-9, 2006.
- BOELAERT, M.; et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 1, p.72-7, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0742-4.
- DA COSTA C.A.; et al. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, n. 1, p. 21-5, 1991.
- DEANE M.P.; DEANE L.M. Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará. *Hospital (Rio de Janeiro)*; v. 45, p. 697-702, 1954a.
- \_\_\_\_\_. Encontro de *Leishmanias* nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital (Rio de Janeiro)*, v. 45, p. 419-421, 1954b.
- \_\_\_\_\_. Infecção experimental de *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *Hospital (Rio de Janeiro)*, v.45, p. 651-653, 1954c.
- FERREIRA, S.; ITUASSU L.; MELO, M.; ANDRADE, A. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 152, p. 257-263, 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-%20Glasel.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2009.
- GONTIJO, C; MELO, M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.
- 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.
- LACHAUD, L.; et al. Comparison of Six PCR Methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**,v. 100, n. 8, p.811-27, 2005.
- LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. Sequency homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 101, p. 229-232, 1999.
- MAIA, C.; et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet J**, n.179, p. 142–144, 2009.
- MARY C.; FARAUT F.; LASCOMBE L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5249-55, 2004.

MATHIS A, DEPLAZES P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1145-9, 1995.

METTLER, M.; et al. 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.

MOHAMMED, A.R.; et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal Leishmaniasis: comparison of ELISA, immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 271-4, 1986.

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

PIARROUX, R.; et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 3, p.746-9, 1994.

SALOTRA, P.; SINGH, R. Rapid & reliable diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 122, n. 6, p. 464-7, 2005.

SAS- Statistics Analysis Systems Institute.1999 User's guides. North Caroline: SAS Institute Inc. 1999.

SIDDIG, R.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D.C.; PETERS, E.A. Visceral leishmaniasis in Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 66-8, 1988.

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

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