
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA ATRAVÉS
DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

por

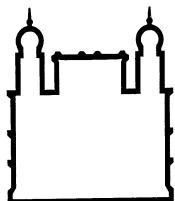
Patrícia Flávia Quaresma

Belo Horizonte
Fevereiro/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA ATRAVÉS
DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

por

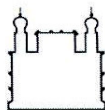
Patrícia Flávia Quaresma

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira
Gontijo

Co-orientação: Dra. Silvane Maria
Fonseca Murta

**Belo Horizonte
Fevereiro/2007**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da trigésima primeira defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Patrícia Flávia Quaresma, sob a orientação da Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo e co-orientada pela Dra. Silvane Maria Fonseca Murta.

Das vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e sete, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da trigésima primeira dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos procedimentos para a obtenção do

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Geraldo e Lúcia, e ao Igor, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa do Dr. Álvaro Romanha, pelo apoio. Ao Laboratório de Leishmanioses, na pessoa do Dr. Edelberto Santos Dias, pela estrutura, equipamentos, reagentes e pela acolhida. À FIOCRUZ (PAPES III) e à FAPEMIG.

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, pela orientação constante, pelos ricos ensinamentos, pela confiança, paciência, dedicação e empenho durante todo o trabalho. Mas especialmente, pela amizade e exemplo de integridade, ética e sabedoria na profissão e na vida.

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, pela colaboração, boa vontade, pelos ricos ensinamentos e principalmente pelo interesse e comprometimento no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Leishmanioses, Ricardo, Érika, Kênia, Daniela, Renato, Joyce, Karla, Joãozinho, Gustavo Paz, D. Alda, Leco, Regina, Gustavo Mayr, Déborah, Cristiane pela agradável convivência. Especialmente aos amigos muito queridos Lutiana, Rafael, Fábio, Cynthia, Eduardo, Filipe, Ivo e Sidney pela amizade verdadeira e pela ajuda em várias etapas do trabalho, mas principalmente pela alegria, companheirismo e apoio constante.

Muito especialmente à Tina, pela boa vontade, pelo auxílio em várias tarefas e, acima de tudo, pelo carinho e pela amizade. À Kenya, pela paciência, alto astral e amizade. À Lara, pelos cafés e pelas conversas, mas acima de tudo pelo companheirismo e dedicação de uma grande amiga.

À Ana Amélia P. Xavier pela valiosa colaboração na primeira etapa

do projeto. À Daniela Paes, pela convivência e pelo carinho de sempre.

À todos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, especialmente à Juciane, Fernanda Freire e Fernanda Barbosa, pela paciência e boa vontade sempre.

Ao Bernardo Franklin pelo auxílio na análise de alguns resultados e à Anna Carolina Lustosa Lima pela ajuda nas análises estatísticas.

À minha inesquecível turma de graduação na UFOP, pelos momentos inesquecíveis, pelo sentimento verdadeiro de coletividade, por terem me ensinado a dividir, colaborar e compartilhar sempre.

Às minhas queridas amigas, Danielli e Michelle, pela amizade sincera e incondicional, pela presença constante, pela paciência em todos os momentos, pelo incentivo e principalmente, pela alegria e carinho de verdadeiras irmãs.

À família Coelho: Cosme, Verinha, Michael, Milene e Mickaelle por terem me acolhido e pelos momentos de alegria e descontração.

À minha linda família: meus pais, Geraldo e Lúcia, e minha irmã Carla, pelo lar rico de união, carinho, serenidade e muito amor. Aos meus pais pelos esforços e sacrifícios incontáveis, estando ao meu lado sempre, mas principalmente, pela confiança e incentivo.

Ao meu amor Igor, pela cumplicidade, companheirismo, muita paciência, carinhos e cuidados, compartilhando comigo sua grandeza de sentimentos e atitudes, mostrando-me os caminhos para me tornar uma pessoa melhor e me fazendo imensamente feliz.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
1. A LEISHMANIOSE VISCERAL	19
2. A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	23
3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LVC.....	25
4. CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>LEISHMANIA</i>	29
5. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEISHMANIA UTILIZANDO PCR-RFLP	31
6. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	34
JUSTIFICATIVA	37
OBJETIVOS.....	39
1. Objetivo Geral.....	39
2. Objetivos específicos.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1. AMOSTRAS	41
2. MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO.....	44
2.1. Diagnóstico Parasitológico.....	44
2.1.1. Exame de lâminas.....	44
2.1.2. Mielocultura.....	44
2.2. Diagnóstico Sorológico.....	45
2.2.1. ELISA - Ensaio Imunoenzimático.....	45
2.2.2. DAT - Direct Agglutination Test.....	46
2.2.3. RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta.....	47
3. MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO	48
3.1. Cultivo e lavagem de promastigotas de <i>Leishmania</i>	48
3.2. Extração de DNA das massas de promastigotas.....	49
3.3. Extração de DNA das amostras clínicas.....	50
3.3.1. Sangue periférico total e medula óssea.....	50
3.3.2. Pele.....	51
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	51
3.4.1. PCR para o gênero <i>Leishmania</i>	52

3.4.2. PCR para amplificação do gene β globina	52
3.4.3. Visualização dos resultados	53
4. PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE <i>LEISHMANIA</i>	54
5. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE <i>LEISHMANIA</i>	56
5.1. Clonagem dos fragmentos dos genes do kDNA e β globina	56
5.2. PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR)	60
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
RESULTADOS.....	62
1. PCR CONVENCIONAL PARA O GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	63
1.1. Avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR.....	63
1.2. Eficácia de diferentes amostras clínicas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	64
1.3. Desempenho da PCR para o diagnóstico da LV em cães assintomáticos e sintomáticos.....	66
1.4. Desempenho da PCR para o diagnóstico da LV em cães agrupados de acordo com os resultados de exames convencionais	67
2. COMPARAÇÃO ENTRE A PCR E OS MÉTODOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO CONVENCIONAL	70
3. AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE A PCR E OS MÉTODOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO CONVENCIONAIS.....	73
4. IDENTIFICAÇÃO DA(S) ESPÉCIE(S) DE <i>LEISHMANIA</i> ATRAVÉS DA PCR-RFLP	74
5. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE <i>LEISHMANIA</i> ATRAVÉS DO qPCR.....	75
5.1. Avaliação da especificidade dos iniciadores e estabelecimento das curvas-padrão para os genes kDNA e β -globina.....	75
5.2. Avaliação da carga de DNA de <i>Leishmania</i> em diferentes tecidos de cães com ECP e ECN, assintomáticos e sintomáticos.....	78

DISCUSSÃO.....	81
1. A PCR NO DIAGNÓSTICO DA LVC	84
2. A PCR E AS FORMAS CLÍNICAS	87
3. IDENTIFICAÇÃO DA(S) ESPÉCIE(S) DE <i>LEISHMANIA</i> ATRAVÉS DA PCR-RFLP	92
4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE <i>LEISHMANIA</i> ATRAVÉS DO qPCR.....	95
CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXOS.....	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Formas amastigota de *Leishmania* mostrando a localização do cinetoplasto e diagrama esquemático do minicírculo do kDNA, com as regiões variável e conservada. As setas indicam o local aproximado do anelamento dos primers 1 e 2. 48
- Figura 2** - Mapa mostrando as características do vetor TOPO PCR 2.1 e a seqüência em torno do sítio de clonagem. Os sítios de restrição estão marcados para indicar o local exato de clivagem. As setas indicam o início da transcrição pela T7 polimerase. 57
- Figura 3** - Fragmentos de 118pb do gene β globina do cão (A) e de 120pb do kDNA de *Leishmania* (B), amplificados a partir de DNA extraído de colônias bacterianas contendo os plasmídeos recombinantes. PM - marcador de peso molecular ϕ X 174 digerido por Hae III; 1 a 13 - diferentes colônias de bactérias contendo os genes clonados; CP - controles positivos: DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania* (A) e sangue de cão não infectado proveniente do canil da UFOP, Ouro Preto. 59
- Figura 4** - Perfil de bandas gerado após a amplificação de diluições seriadas de DNA purificado de promastigotas de *L. (L.) chagasi* com os iniciadores A e B. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. 64
- Figura 5** - Comparação entre a proporção de positivos nas diferentes amostras clínicas coletadas de cães provenientes de área endêmica do município de Belo Horizonte. A - cães assintomáticos, B - cães sintomáticos. 66
- Figura 6** - Porcentagem de cães assintomáticos e sintomáticos positivos para a PCR em pelo menos um dos tecidos avaliados. 66
- Figura 7** - Comparação da porcentagem de cães positivos na PCR das amostras pele, sangue e medula entre os grupos clínicos sintomáticos e assintomáticos 67

Figura 8 - Porcentagem de cães positivos para a PCR em pelo menos um dos tecidos avaliados no grupo de animais com exames convencionais negativos (ECN) e exames convencionais positivos (ECP). 68

Figura 9 - Porcentagem de cães positivos para a PCR em pelo menos um dos tecidos no grupo de animais com exames parasitológicos e sorológicos convencionais negativos (PNSN), parasitológicos convencionais negativos e sorológicos positivos (PNSP) e parasitológicos e sorológicos convencionais positivos (PPSP). 69

Figura 10 - Comparação dos resultados de testes sorológicos entre os cães sintomáticos e assintomáticos mostrando a diferença na proporção de cães com sorologia positiva entre os grupos clínicos. 71

Figura 11 - Comparação dos resultados de testes parasitológicos convencionais entre os cães sintomáticos e assintomáticos mostrando a diferença na proporção de cães positivos entre os grupos clínicos. 72

Figura 12 - Comparação da proporção de positivos entre os três diferentes métodos diagnósticos testados. 72

Figura 13 - Fragmentos de restrição gerados após digestão dos amplicons de 120pb da região conservada do kDNA de *Leishmania* pela enzima Hae III. Gel de poliacrilamida 10% corado pela prata. 74

Figura 14 - Amplificação dos genes kDNA de *Leishmania* e β globina por qPCR. A - Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de 120pb do kDNA e da β globina. Os gráficos mostram os valores de CT obtidos para cada uma das diluições. B - Gráficos da dissociação temperatura-dependente do SYBR Green mostrando a especificidade da amplificação dos genes kDNA de amostras de sangue (1), medula (2) e β globina (3). 77

Figura 15 - Comparação da proporção de moléculas de kDNA de *Leishmania* determinado por qPCR no sangue e na medula dos cães avaliados; A - não houve diferença significativa na carga parasitária entre os dois tecidos de todos os 35 cães ($p = 0,076$). B - houve diferença na carga parasitária entre os dois tecidos dos cães com ECP. 78

Figura 16 - Número de moléculas de DNA de *Leishmania* determinado por qPCR na medula de cães com ECN e ECP. Houve uma densidade parasitária significativamente mais alta na medula dos cães com ECP. 79

Figura 17 - Comparação do número de moléculas de kDNA de *Leishmania* determinado por qPCR na medula de cães dos grupos PNSN, PNSP e PPSP. Houve uma densidade parasitária significativamente mais alta na medula dos cães PPSP. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies <i>L. (L). amazonensis</i> , <i>L. (V). braziliensis</i> e <i>L. (L). i. chagasi</i> .	54
Tabela 2 - Detecção do DNA de <i>Leishmania</i> sp. através da PCR em diferentes amostras clínicas coletadas de cães provenientes de área endêmica do município de Belo Horizonte.	65
Tabela 3 - Resultados de exames sorológicos, parasitológicos convencionais e PCR realizados em 217 cães, provenientes de área endêmica do município de Belo Horizonte, de acordo com o quadro clínico.	70
Tabela 4 - Resultados da PCR nos grupos de animais com sorologia negativa e positiva separados de acordo com o quadro clínico.	71
Tabela 5 - Concordância entre a PCR e os métodos sorológico e parasitológico convencional utilizados para o diagnóstico da LVC.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
COBEA	Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação
DAT	Direct Agglutination Test - (Teste de Aglutinação Direta)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
ECN	Grupo de cães com Exames Convencionais Negativos
ECP	Grupo de cães com Exames Convencionais Positivos
ELISA	Enzyme-linked immunossorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)
Fg	fentogramas
k	Índice kappa
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Tryptose - (Infusão de fígado triptose)
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MS	Ministério da Saúde
µL	microlitros
Ng	nanogramas
NNN	Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle
OD	Densidade óptica
PBS	Phosphate Buffer Solution - (Tampão salina fosfato)
Pb	pares de bases
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR	Polymerase chain reaction - (Reação em cadeia da polimerase)
PNSN	Grupo de cães com exames Parasitológicos e Sorológicos convencionais negativos
PNSP	Grupo de cães com exames Parasitológicos convencionais Negativos e Sorológicos Positivos
PPSP	Grupo de cães com exames Parasitológicos e Sorológicos convencionais Positivos
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
U	unidades

RESUMO

Neste estudo investigou-se a eficácia da PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) e o desempenho da PCR-RFLP para a identificação da espécie de *Leishmania*. Além disso, a técnica PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi padronizada para a quantificação do número de cópias de kDNA. Foram analisadas amostras de pele, sangue e medula de 217 cães classificados como assintomáticos e sintomáticos. Com base nos resultados de exames sorológicos e parasitológicos convencionais, os animais foram divididos em dois grupos: cães com exames convencionais negativos (ECN = 70) e com exames convencionais positivos (ECP = 147). A presença do parasito em amostras clínicas foi investigada através da amplificação de um fragmento de 120 pb da região conservada do kDNA de *Leishmania*. Os resultados mostraram que a PCR detectou DNA do parasito até a concentração de 0,1 fg. As amostras pele e medula foram as mais adequadas para a realização do diagnóstico através da PCR. No grupo **ECN**, 95% dos cães apresentaram PCR positiva em pelo menos uma amostra clínica e no grupo **ECP**, aproximadamente 96% dos cães foram PCR positivos. A identificação da espécie de *Leishmania* através da PCR-RFLP revelou que 192 cães estavam infectados por *Leishmania infantum chagasi* e 2 por *Leishmania braziliensis*. A análise do *real time* PCR revelou que na medula dos cães com ECP havia maior número de cópias de DNA de *Leishmania* do que no sangue e que a comparação da carga parasitária entre os cães sintomáticos e assintomáticos não apresentou diferença significativa. Nossos resultados revelam que a PCR é sensível e útil para detecção de *Leishmania* em amostras clínicas de cães naturalmente infectados e que a PCR-RFLP mostrou ser uma ferramenta rápida e sensível para identificação de espécies. Além disso, o qPCR mostrou ser uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de *Leishmania*.

ABSTRACT

In the present investigation, we assessed the effectiveness of polymerase chain reaction (PCR) for canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis as well as restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) for identification of the *leishmania* species. Moreover, SYBR Green real time PCR was standardized in order to have the number of kDNA copies quantified. Canine samples under analysis comprised skin, blood and bone marrow from 217 dogs, classified into asymptomatic and symptomatic for CVL. The animals were divided into two groups according to results from serological and parasitological conventional examinations: negative conventional examinations (NCE = 70) and positive conventional examinations (PCE = 147). The presence of parasite in clinical samples was investigated through amplification of a 120 bp fragment of the *Leishmania* kDNA. Our results revealed that PCR showed to be capable to detect *Leishmania* DNA up to the concentration of 0.1 fg. Skin and bone marrow samples provided the most accurate results by PCR. In group NCE, 95% of the animals showed to be positive for at least one of the clinical samples and, in the group PCE, approximately 96% of the dogs were PCR-positive. PCR amplified products from positive samples were further analyzed by RFLP and the species identified was *L. infantum chagasi* (192 dogs) and *L. braziliensis* (2 dogs). Real time PCR has shown that the bone marrow samples from PCE dogs contained a higher number of *Leishmania* DNA copies than blood; also, the parasitic load between asymptomatic and symptomatic animals showed no significant difference. Our results show that PCR is a sensitive and useful tool for *Leishmania* detection in clinical samples from naturally infected dogs as well as RFLP, which was capable to provide the species identification. Furthermore, real time PCR showed to be a promising methodology for studies on *Leishmania* DNA quantification.



INTRODUÇÃO

1. A LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são consideradas primariamente zoonoses podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito. Atualmente, encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (TDR/WHO, 2006). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais podem provocar no homem duas formas principais: cutânea e visceral (WHO, 1990). Afetam populações de 88 países, sendo que mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru, e aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem predominantemente nos países em desenvolvimento: Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WHO, 2006). As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) doenças emergentes ou não-controladas, onde o foco de pesquisa está na aquisição de novos conhecimentos sobre métodos de diagnóstico e drogas terapêuticas e no planejamento de estratégias para seu controle.

A posição taxonômica e a origem do agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no novo mundo tem sido uma questão polêmica e muito discutida. Desde que Cunha e Chagas (1937) descreveram e incriminaram a *Leishmania chagasi* como uma nova espécie responsável pela doença nas Américas, a sua origem tem sido objeto de muito debate e especulação. Alguns autores separam *L. infantum*, o agente etiológico da LV no velho mundo, e *L. chagasi* em duas espécies (Lainson & Shaw 1987; Palatnik et al. 1990; Ellis & Crampton 1991, Gramiccia et al. 1992). Outros acreditam que estes parasitos são diferentes, mas decidiram separá-los em duas subespécies (Lainson & Rangel 2005). E ainda, alguns pesquisadores acreditam que *L. chagasi* e *L. infantum* são sinônimos, e que a primeira foi importada da Europa no período da colonização portuguesa e espanhola (Killick-Kendrick 1985; Rioux

et al. 1990; Dantas-Torres 2006). Entretanto, até o momento nenhuma destas classificações foram consensualmente aceitas. Desta forma, decidimos adotar neste trabalho a nomenclatura proposta por Shaw (2006), *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. O autor afirma que ainda existem muitas perguntas acerca da origem, identidade e epidemiologia dos parasitos causadores da LV no novo mundo, por isso é mais prudente utilizar esta nomenclatura.

O ciclo de vida da *L. i. chagasi* inclui uma fase no tubo digestivo do vetor flebotomíneo - *Lutzomyia longipalpis*, e outra em diferentes hospedeiros vertebrados - canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e domésticos (*Canis familiaris*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e roedores principalmente dos gêneros *Rattus*, *Mus*, *Bolomys*, *Oryzomys*, *Akodon* (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006; Oliveira et al. 2005). O hábito sinantrópico destes hospedeiros pode favorecer o intercâmbio entre os ciclos silvestre e doméstico.

A transmissão ocorre pela picada de fêmeas de insetos da ordem Díptera, Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae. No momento do repasto sanguíneo, ao picarem um animal infectado, estes insetos sugam juntamente com o sangue formas amastigotas que após atingirem o tubo digestivo se transformam em promastigotas e se multiplicam intensamente. Em seguida, migram para as partes anteriores do tubo digestivo do flebotomíneo, o qual ao picar outro animal poderá regurgitar as formas promastigotas metacíclicas. Estas formas serão fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos, onde irão se transformar em amastigotas e se multiplicar.

Nas Américas a LV ou calazar é considerada uma zoonose que, inicialmente estabeleceu-se em áreas rurais, mas atualmente também ocorre em áreas peri-urbanas e urbanas. A LV no Brasil encontra-se em franca expansão, e desde a década de 90 vem

ocorrendo o aumento significativo do número de casos (Gontijo & Melo 2004). Com o processo de urbanização, o perfil epidemiológico das leishmanioses passou a ser variável e específico para cada área. A doença deixou de ser primariamente silvestre e passou a se estabelecer em áreas rurais e também em regiões urbanas, desde que haja fatores propícios para a sobrevivência dos vetores e a permanência de animais vertebrados que funcionem como reservatórios mantendo o parasito nestes ambientes. A LV assumiu, então, um papel importante na saúde pública de inúmeras regiões e, uma vez estabelecido um foco de transmissão, muitas pessoas serão acometidas até que medidas de controle comecem a conter o avanço da doença. Além disso, a *Leishmania* é um protozoário que apresenta ciclo de vida complexo em dois hospedeiros, exigindo um grande número de ações de controle.

Os cães são considerados os mais importantes reservatórios domésticos e certamente contribuem para a mudança no perfil epidemiológico da doença (Marzochi et al. 1994). Na transmissão da *L. i. chagasi*, o homem serve apenas como uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos e a transmissão depende largamente da presença de cães infectados (Laison & Shaw, 1987). O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, o que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (Deane & Deane, 1954). Entretanto, é provável que em algumas situações específicas, existam outras fontes de infecção (Deane & Deane 1955 a e b) e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão, como por exemplo, no caso de pacientes imunodeficientes portadores do HIV (Arias et al. 1996).

Com o aumento considerável do número de casos de LV em regiões urbanas e o conseqüente surgimento de focos da doença em áreas até então indenes, várias cidades de médio e grande porte se tornaram áreas de intensa transmissão. Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e

urbanização da LV, 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), (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). Seguindo essa tendência, nos últimos anos, o número de casos de LV na região metropolitana de Belo Horizonte aumentou de forma expressiva, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença nesta área, onde o município de Belo Horizonte aparece como o responsável pelo maior número de casos (Silva *et al.*, 2001). A existência de casos humanos parece estar fortemente relacionada à ocorrência da doença canina nesta e em outras regiões endêmicas. De fato, Oliveira *et al.* (2001) observaram uma forte evidência de que os casos humanos de LV no município de Belo Horizonte no período de 1994 a 1997 ocorreram em áreas onde a taxa de prevalência da doença em cães era alta. Assim, a leishmaniose visceral canina (LVC) se tornou um importante problema de saúde pública e veterinária e sua incidência vem aumentando apesar da existência de um programa nacional de controle que enfatiza a identificação e eliminação dos cães soropositivos (Arias *et al.* 1996; MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

2. A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A importância do cão na transmissão da leishmaniose visceral tem sido investigada por vários autores. Cães infectados por *L. i. chagasi* desenvolvem lesões cutâneas e viscerais (Slappendel, 1988) a despeito da natureza viscerotrópica desse protozoário. Independente da presença de lesões cutâneas, a pele parece representar o principal tecido reservatório de amastigotas (Manna et al., 2004) e, por conseqüência, o cão é uma fonte intermitente de infecção para os flebotomíneos.

A doença no cão é de evolução lenta e insidiosa. A LVC é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (Barbieri et al. 2006). As características clínicas do calazar canino variam muito, devido a numerosos mecanismos patogênicos envolvidos na evolução da doença e à diversidade da resposta imune desenvolvida pelos diferentes indivíduos (Mancianti et al., 1988). Os sinais clínicos e o tempo transcorrido até o aparecimento da doença variam enormemente, de dois meses a sete anos, podendo o cão nunca desenvolver a doença (Gaeta et al. 1994; Slappendel, 1988; Rioux et al. 1990). Dessa maneira, o quadro clínico no cão infectado pode variar desde animais aparentemente saudáveis até estágios severos da doença. Existem várias maneiras de classificar as formas clínicas nestes animais (Reis et al. 2006), mas a proposta de Mancianti et al. (1988) é a mais empregada. Nesta classificação, os cães infectados são divididos em polissintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos. Uma característica muito importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Porém mesmo sem sinais clínicos, os cães podem estar infectados e transmitirem os parasitos para os insetos vetores. Molina et al. (1994) mostraram que de cinco cães assintomáticos com sorologia positiva, três foram capazes de infectar

flebotomíneos tão bem quanto os sintomáticos. Michalsky (2004) utilizando experimentos de xenodiagnóstico, verificou que dentre seis cães assintomáticos, dois infectaram flebotomíneos.

A história natural e a evolução do calazar canino variam amplamente entre os indivíduos infectados. Muitos cães nunca evoluem para doença, através de mecanismos não muito bem conhecidos de auto-cura, outros ficam gravemente afetados progredindo rapidamente para morte. A despeito destas diferenças individuais, geralmente formas amastigotas de *Leishmania* são encontradas em muitos órgãos internos dos cães, como também no sangue, pele e até mesmo na saliva desses hospedeiros (Deane, 1956; OMS, 1990; Abranches et al. 1991). Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada infectiva, posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e mais tarde podem se tornar distribuídos através da derme (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

No Brasil os cães têm sido o alvo das ações de controle desde a década de 50, baseado em evidências que mostram seu envolvimento no ciclo de transmissão da LV (Marzochi et al., 1985; MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). A detecção e eliminação dos cães soropositivos têm sido prioridade em vários municípios brasileiros onde a LV é endêmica; entretanto, a eficácia desta abordagem vem sendo muito questionada (Arias et al. 1996; Costa 2001). Existe uma incerteza muito grande com relação ao emprego desta medida, pois em muitos locais apesar de ser amplamente empregada, a eutanásia de cães sorologicamente positivos parece não ter efeito algum na redução do número de casos humanos (Costa et al. 1991).

3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LVC

O Ministério da Saúde atualmente recomenda que o diagnóstico laboratorial da LVC seja baseado no exame parasitológico ou sorológico (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). No entanto, devido à maior rapidez e ao menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle. De uma maneira geral, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, principalmente devido à inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível. Os mais utilizados são a RIFI e o ELISA, mas estes métodos nem sempre alcançam sensibilidades e especificidades satisfatórias, já que muitos animais infectados apresentam testes sorológicos negativos. Existem evidências de que os índices de prevalência da infecção por *Leishmania* em áreas endêmicas são mais altos que aqueles confirmados por estudos sorológicos (Zaffaroni et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2001).

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico de punções hepática, esplênica, de medula óssea, de linfonodos e biópsia ou escarificação de pele. O exame parasitológico é classicamente utilizado para confirmar a LVC pela demonstração direta do parasito. Os mais utilizados são o exame microscópico de esfregaços por aposição de tecidos, o isolamento do parasito em meios de cultura e a inoculação em hamster. Estes métodos detectam o parasito em animais com doença patologicamente confirmada em menos de 80% das vezes (Ashford et al. 1995). Esta sensibilidade é dependente da quantidade de parasitos presentes, tipo de material biológico e do tempo de leitura da lâmina, sendo menor nos assintomáticos que nos sintomáticos. Portanto, a sensibilidade pode ser diminuída devido a problemas de contaminação da cultura, inexperiência na leitura de lâminas e às dificuldades na manutenção de hamsters por um período

relativamente longo de incubação. A inoculação em hamster é dificultada devido ao alto custo ou a ausência de colônias mantidas em condições estéreis. A detecção de parasitos pelo exame microscópico de esfregaços de tecidos é dependente da presença de muitos organismos no aspirado ou na amostra de tecido coletada. Análises histopatológicas de órgãos infectados tais como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, podem também ser utilizadas para detectar parasitos intracelulares (Tafuri et al. 2001). Entretanto, estes métodos parasitológicos são limitados pela baixa sensibilidade, requerem repetidas amostragens de tecidos e técnicos de laboratório experientes, além de serem muito invasivos, demorados e laboriosos, portanto inapropriados para estudos epidemiológicos e principalmente para subsidiar as ações de controle.

Os procedimentos sorológicos tradicionalmente utilizados para o diagnóstico da LVC incluem, principalmente, técnicas como: RIFI - imunofluorescência indireta (Badaró et al. 1983 e 1986), ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (Badaró et al. 1986), reação de fixação de complemento (Hockmeyer et al. 1984), hemaglutinação direta e hemaglutinação indireta (Harith et al. 1986). Porém, as mais utilizadas são a RIFI e o ELISA, devido à melhor sensibilidade e especificidade das mesmas em comparação às demais (Badaró 1983, Guimarães et al. 1990). Além destes, outros métodos têm sido testados para a detecção da infecção canina, como por exemplo, um novo teste de aglutinação direta (DAT). Oskam et al. 1996 avaliaram essa técnica baseada em antígeno estável e liofilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros caninos, e os seus resultados mostraram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,8%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução. A desvantagem é que este antígeno ainda não é produzido no Brasil, limitando a execução do teste por causa do alto custo de importação.

O diagnóstico sorológico possui sensibilidade e especificidade satisfatórias em cães sintomáticos, porém é mais difícil nos assintomáticos e naqueles com poucos sintomas. Nestes casos e também para propósitos epidemiológicos, é necessário um teste com alta sensibilidade.

Em áreas endêmicas do Brasil, que tem a mais alta prevalência de leishmaniose visceral do hemisfério ocidental, os programas de controle do calazar são baseados em três medidas principais: identificação e tratamento dos doentes, combate aos insetos vetores e eliminação de cães soropositivos. A detecção de cães infectados é feita através de sorologia, principalmente a RIFI e, apesar destes hospedeiros serem periodicamente examinados, essa técnica não permite a detecção de todos os cães parasitados por *Leishmania*, fazendo com que um grande número de cães infectados passem por negativos. Este fato é relevante e pode ser grave, já que existe uma suspeita de que os cães falso-negativos podem continuar sendo fonte de infecção para os flebotomíneos. Além disso, é grande o número de reações cruzadas dos testes sorológicos e eles não são aptos a discriminar entre infecções passadas e atuais (Schulz et al. 2003). Em resumo, a falha nos programas de controle em conter o aumento do número de casos de LVC pode ser devido a demora na retirada dos cães positivos aliada a rápida reposição de cães nas áreas de transmissão, bem como às limitações dos métodos sorológicos de diagnóstico do calazar canino. Dessa forma, é imprescindível a busca por técnicas mais sensíveis e específicas para diagnosticar a LVC.

Métodos diagnósticos utilizando o DNA têm sido exhaustivamente explorados visando superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam. Vários trabalhos têm mostrado que os ensaios moleculares permitem uma detecção mais rápida e sensível de diversas doenças parasitárias além da possibilidade de caracterização dos microrganismos

envolvidos. De acordo com Reithinger et al. (2000), Leontides et al. (2002) e Schonian et al. (2003), técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem prover um melhor desempenho no diagnóstico da LVC. Diferentes métodos de extração de DNA, diferentes pares de iniciadores, alvos distintos do DNA e amostras de vários tecidos (sangue, medula, pele, fígado, baço e outros) têm sido comparados (Lachaud et al. 2001), sendo que em grande parte destes estudos a PCR tem mostrado ser uma ferramenta mais específica e sensível que os métodos tradicionais, além da possibilidade de ser realizada em vários tipos de amostras biológicas.

Iniciadores desenhados para amplificar sequências alvo de multicópias, como a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto, têm facilitado o diagnóstico de infecções por *Leishmania* (Reale et al. 1999; Singh et al. 1999; Smyth et al. 1992). Outras seqüências alvo também podem ser utilizadas na PCR, como o DNA ribossomal e a região espaçadora entre os transcritos internos ou "internal transcribed spacer" (ITS-1) deste gene (Nasereddin et al. 2006). O kDNA contém aproximadamente 10.000 minicírculos de DNA, que têm um tamanho entre 600 e 800 pb em todas as espécies do gênero *Leishmania*. Cada minicírculo é dividido em uma região conservada de aproximadamente 150pb e uma região variável de 600pb (Morales et al. 2001). Iniciadores dirigidos para amplificar a região conservada podem ser utilizados para detectar todas as espécies de *Leishmania* (Degrave et al. 1994), enquanto aqueles dirigidos para a região variável originam produtos que são diferenciados para cada espécie ou complexo de espécies existentes (de Bruijn & Barker 1992; Eresh et al. 1994; Cortes et al. 2004). Rodgers e cols. (1990), mostraram que a PCR pode detectar o kDNA equivalente a um parasito. Entretanto, a PCR ainda não foi padronizada para sua utilização no diagnóstico de rotina da doença, mas grandes esforços têm sido feitos nesse sentido.

4. CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE *LEISHMANIA*

A identificação dos parasitos presentes em uma área endêmica é de extrema importância em estudos epidemiológicos, que buscam conhecer a(s) espécie(s) que circula(m) em determinado foco de transmissão da doença. É importante acumular informações sobre um determinado organismo, uma vez que algumas das características estudadas poderão ser úteis no descobrimento e desenvolvimento de drogas terapêuticas e vacinas, aliados importantes nos programas de controle da doença.

A partir da descrição do gênero *Leishmania* Ross, 1903, surgiram as primeiras tentativas de classificação dos parasitos em espécies considerando, inicialmente, aspectos clínicos e epidemiológicos da doença humana.

Na tipagem das leishmânias as técnicas usadas são adaptadas para a detecção de marcadores específicos usualmente testados para a classificação de outros organismos. No gênero *Leishmania* a morfologia não é um bom caráter para distinguir espécies, pois as diferenças observadas são pequenas e sutis. No entanto, cada vez mais têm sido descobertos novos caracteres, a partir de métodos mais avançados, que auxiliam na caracterização taxonômica das espécies deste gênero.

Atualmente são considerados bons marcadores, desde as análises de isoenzimas e determinantes antigênicos com anticorpos monoclonais até uma série de métodos moleculares usados em análises de DNAs com especificidade variável dependendo da natureza da seqüência-alvo investigada (Floeter-Winter & Shaw, 2004).

Vários sistemas taxonômicos que consideram os níveis de subgênero, espécie e subespécie têm sido propostos, mas até o momento não existe uma classificação amplamente aceita que incorpore todos estes elementos. O modelo taxonômico mais utilizado no momento foi proposto por Lainson e Shaw (1987) sendo

as espécies de *Leishmania* divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Atualmente, o número total de espécies está em torno de 30, sendo que cerca de 20 infectam humanos (Cupolillo et al. 1994; Volpini 2003). Como a classificação de qualquer grupo, a de *Leishmania* está sujeita a mudanças com a aquisição de novas informações, sendo necessária a utilização do maior número possível de caracteres (Gontijo 2000). Dessa forma, com o passar do tempo novas espécies são descobertas e descritas, assim como as relações filogenéticas dentro do grupo vão sendo elucidadas. Daí a necessidade de metodologias que possibilitem a investigação de características específicas para que ao se isolar um organismo seja mais fácil sua identificação com base em comparações com características já estabelecidas.

No Brasil, é consenso que apenas uma espécie é causadora da LV tanto em cães quanto em humanos, contudo a hipótese da existência de polimorfismos entre cepas isoladas destes diferentes hospedeiros tem sido aventada. Esta diversidade ajudaria a explicar as diferenças observadas na evolução e manifestações clínicas em cães.

Com a utilização de técnicas moleculares nos estudos epidemiológicos, muitos conhecimentos acerca das relações entre as espécies, bem como entre cepas da mesma espécie poderão ser gerados, contribuindo para o entendimento do comportamento do parasito, sua relação com os vetores e hospedeiros nos diversos ambientes onde a transmissão se processa.

5. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* UTILIZANDO PCR-RFLP

Dentro deste quadro taxonômico complexo do gênero *Leishmania* pergunta-se qual seria a importância prática da identificação destes patógenos. A caracterização da espécie é particularmente importante em regiões onde ocorrem simultaneamente, a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar. Achados recentes relatam a dispersão da *L. i. chagasi* para áreas de ocorrência da *L. braziliensis* (Camargo-Neves 2004). Visto que estes novos focos aparecem em áreas onde a LV não é tradicionalmente prevalente, o principal problema é distinguir entre casos autóctones e infecções adquiridas em outras áreas endêmicas. Na LVC, as manifestações clínicas causadas por diferentes espécies podem ser semelhantes e se sobrepor. Como se sabe a infecção por *L. i. chagasi* no cão pode causar lesões cutâneas assim como observado nas infecções por *L. braziliensis*. Portanto, com base no diagnóstico clínico não é possível saber com segurança qual espécie está parasitando o animal. Os métodos diagnósticos de rotina também não são capazes de fazer esta distinção.

Atualmente, o procedimento mais empregado para a identificação de vários parasitos, é a análise de isoenzimas, método este considerado como ferramenta-ouro na identificação de isolados de *Leishmania* (Cupolillo et al. 1994; 1995 a e b). O polimorfismo entre os aminoácidos é responsável pela mudança na mobilidade da enzima produzindo diferentes fenótipos ou zimodemas (Rioux et al. 1990). Esta técnica requer o isolamento e crescimento do parasito em meio de cultura, porém muitas cepas são de difícil isolamento e manutenção em cultura. O cultivo de promastigotas é raramente feito no diagnóstico de rotina por ser um método trabalhoso, demorado e que requer muita experiência (Schallig & Oskam 2002; Ferreira et al. 2007). Um outro aspecto relevante a ser considerado são as contaminações da cultura por

outros microrganismos, que acontece com relativa frequência apesar de todos os cuidados tomados. Uma grande desvantagem da análise de isoenzimas é a falta de padronização da técnica entre laboratórios o que pode impedir a comparação de resultados. Além da análise de zimodemas, existem outras formas de caracterizar o parasito tais como: uso de anticorpos monoclonais (Grimaldi et al. 1987), análise de esquizodemas e o emprego de sondas de DNA (Weigle et al., 2002), porém são técnicas menos utilizadas por serem também muito laboriosas e muitas vezes inconclusivas.

Buscando contornar estas dificuldades e encontrar uma forma mais rápida, barata e segura de caracterizar os parasitos de amostras clínicas, algumas ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas separadamente ou em associação. Na escolha de um método de identificação deve-se considerar que sua eficiência dependerá, dentre outros fatores, do tipo de amostra utilizada e do nível de especificidade desejado. A aplicação de alguns métodos, como por exemplo análise de isoenzimas ou anticorpos monoclonais, é limitada no caso de serem aplicados diretamente em tecidos, já os métodos moleculares não apresentam esta limitação.

A técnica "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) associada à PCR pode ser utilizada para o propósito de identificação de algumas espécies de *Leishmania*. A RFLP utiliza uma ou mais enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos. Atualmente, existem centenas de enzimas de restrição disponíveis no mercado, com as mais variadas seqüências de reconhecimento, isoladas de várias bactérias. Em

fragmentos gerados. Muitos demonstraram que o kDNA das diferentes espécies possuem seqüências suficientemente diferentes para distinguir vários grupos (Barker & Butcher 1983; Lopez et al. 1984; Pacheco et al. 1989). Com o advento da PCR tornou-se possível a associação desta com a RFLP. A PCR trouxe mais confiabilidade à RFLP, por suas características de especificidade ao amplificar uma seqüência alvo conhecida, evitando que fragmentos de um mesmo tamanho, porém com seqüências diferentes possam ser interpretados como a mesma molécula. Após a descrição de um protocolo de PCR-RFLP em *Trypanosoma cruzi* (Ávila et al. 1990), a técnica começou também a ser empregada em *Leishmania*. Para alguns autores com a utilização da PCR-RFLP parece ser possível superar as limitações das técnicas até então empregadas para a identificação de parasitos do gênero *Leishmania* (Kapoor et al. 1998; Volpini et al. 2004; Andrade et al. 2006; Ferroglio et al. 2006).

6. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE PARASITÁRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As enfermidades causadas pelas várias espécies de *Leishmania* são caracterizadas por flutuações no número de parasitos durante o curso da infecção (Leclercq et al. 1996; Mattner et al. 1997; Melby et al. 1998). Na leishmaniose visceral, a carga parasitária pode variar com o tempo após a infecção no mesmo tecido e também entre diferentes tecidos num mesmo momento após a infecção (Melby et al. 1998; Rica-Capela et al. 2003). Quantificar a carga parasitária pode ser uma boa maneira de acompanhar a evolução da infecção e também verificar o efeito de um determinado esquema terapêutico. A maioria dos estudos sobre a imunobiologia de *Leishmania*, triagem, eficácia e desenvolvimento de novas drogas e estudos relacionados à padronização de novas vacinas requer a detecção e quantificação da carga parasitária em diferentes amostras de tecidos. Métodos para quantificação de parasitos precisam ser empregados para verificar a eficácia do tratamento e, conseqüentemente como critério de cura da doença.

A determinação da densidade de parasitos em diferentes amostras biológicas pode ser conseguida através da microscopia, pela contagem de amastigotas em relação aos núcleos das células do hospedeiro em esfregaços do tecido (Stauber et al. 1958; Reis et al. 2006). No entanto é uma técnica consumidora de tempo e pouco acurada considerando que os parasitos não estão distribuídos igualmente nos tecidos e órgãos. A quantificação através dos ensaios de microdiluição limitante em cultura também pode ser utilizada. Porém, esta técnica requer o cultivo do parasito, o que limita a sua execução devido a todas as dificuldades associadas à manutenção da cultura, além de ser extremamente demorado e laborioso (Bretagne et al. 2001). Devido às dificuldades que estas técnicas de quantificação apresentam, métodos baseados na PCR em tempo real têm sido desenvolvidos para

a detecção e quantificação do DNA do parasito em amostras clínicas.

Recentemente uma técnica altamente sensível para o monitoramento contínuo dos produtos amplificados por PCR tem sido aplicada para a quantificação de ácidos nucleicos (Higuch et al. 1993; Bassler et al. 1995; Morrison et al. 1998, 1999; Abe et al. 1999; Donovan et al. 2000). Esta técnica, denominada PCR quantitativo em tempo-real (qPCR), é baseada na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR. Os sinais de fluorescência requeridos para detecção podem ser obtidos pela marcação dos "amplicons" com corante fluorescente. Esta marcação pode ser feita utilizando uma sonda que se liga à seqüência alvo (sistema *Taq-Man*) ou então uma molécula fluorescente que se intercala na dupla-fita de DNA (sistema *SYBR-Green*). Ambos os sistemas combinam um termociclador e um fluorímetro, permitindo o monitoramento contínuo do acúmulo de produto de PCR gerado.

A quantificação através da incorporação do corante fluorescente SYBR-Green na dupla-fita do DNA permite a definição aproximada do ciclo de PCR em que o produto começou a ser formado (Threshold cycle) e por inferência, a quantificação precisa de DNA "template" presente no início da reação. A partir da quantificação de DNA "template" uma estimativa da carga relativa de parasitos pode ser obtida (Mortarino et al. 2004).

A PCR em tempo real também pode ser utilizada para o diagnóstico e identificação de microrganismos pertencentes ao mesmo gênero. A técnica permite não só a quantificação de DNA em várias amostras biológicas, como também a diferenciação de espécies ou cepas de vários microrganismos de importância médica através da análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR (Logan et al. 2001). Dessa maneira, *L. major* foi diferenciada de *L. donovani*, *L. tropica* e *L. infantum*, de acordo com a temperatura de anelamento, a qual é uma função do índice GC/AT,

comprimento e seqüências do produto amplificado. A análise da curva oferece uma alternativa rápida para a identificação de espécies no diagnóstico ou estudos epidemiológicos das leishmanioses e também no monitoramento de parasitoses assintomáticas (Nicolas et al. 2002b).

O qPCR, portanto, é considerado uma ferramenta muito promissora para a detecção e quantificação de parasitos, e já é empregada para *Toxoplasma gondii* (Jauregui et al. 2001), *Borrelia burgdorferi* (Piesman et al. 2001), *Plasmodium falciparum* (Hermsen et al. 2001; Bruña-Romero et al. 2001), *Neospora caninum* (Collantes-Fernanandez et al. 2002) e *Leishmania* (Bretagne et al. 2001; Nicolas et al. 2002a e 2002b; Rolão et al. 2004).



JUSTIFICATIVA

Considerando a importância do cão no ciclo de transmissão de *Leishmania*, a grande dificuldade do diagnóstico da LVC devido às manifestações clínicas variadas e não-específicas e às limitações dos métodos sorológicos, e ainda, o fato de que poucos estudos empregando a PCR foram realizados utilizando diferentes amostras clínicas de cães naturalmente infectados (Ikonomopoulos et al. 2003; Manna et al. 2004), este estudo avaliou a eficácia da PCR no diagnóstico e identificação das espécies de *Leishmania*, ao serem utilizadas amostras de pele, medula óssea e sangue de cães com quadros clínicos distintos, provenientes de área endêmica de LV do município de Belo Horizonte. Além disso, a eficácia do PCR quantitativo em tempo real para a quantificação da carga de DNA de *Leishmania* nestas mesmas amostras clínicas também foi avaliada, visto que poucos trabalhos (Vitale et al. 2004; Francino et al. 2006; Manna et al. 2006) foram realizados empregando essa metodologia em diferentes tecidos de cães provenientes de área endêmica.



OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a PCR como técnica para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, identificar a espécie de *Leishmania* e quantificar a carga parasitária em diferentes amostras clínicas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o desempenho da PCR como método diagnóstico da LVC;
2. Avaliar a concordância entre a PCR e os métodos sorológicos e parasitológicos convencionais;
3. Comparar a eficácia de diferentes amostras biológicas no diagnóstico molecular da leishmaniose em cães apresentando diferentes formas clínicas;
4. Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* através da PCR-RFLP;
5. Padronizar e avaliar a técnica de qPCR para a quantificação de DNA de *Leishmania* em amostras clínicas de cães com diferentes formas clínicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de sangue total, sangue em papel filtro, medula óssea e fragmento de pele íntegra da face interna da orelha de 217 cães (*Canis familiaris*) de ambos os sexos, de idades e raças variadas, provenientes da regional Nordeste de Belo Horizonte, área endêmica para LV.

As amostras foram coletadas nos anos de 2003 e 2004, durante a realização do projeto “Aplicação em campo dos testes de Aglutinação Direta (DAT - Direct Agglutination Test e FAST - Agglutination Sceening Test) para leishmaniose visceral canina no município de Belo Horizonte, Minas Gerais” aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/ FIOCRUZ sob o N° P0119-02 (Anexo 1).

Foram coletadas amostras de sangue total por via endovenosa, especificamente na veia radial, para a obtenção de soro, e sangue em papel filtro (tiras de papel Klabin 80 de 15 x 6 cm) coletado da ponta da orelha dos cães com uma lanceta descartável, para a obtenção de eluato. As amostras de soro foram estocadas em freezer a -20°C e as de papel filtro conservadas a 4°C para a realização das técnicas sorológicas. Também foi feita punção de medula óssea e biópsia de pele da orelha para a realização dos ensaios moleculares.

Durante o período de coletas e após exame clínico foi preenchida uma ficha clínica epidemiológica (Anexo 2), onde constam informações sobre o animal e o seu aspecto geral, procurando por sinais da doença canina.

Com base nas avaliações clínicas, os 217 cães foram classificados como assintomáticos (73 cães) e sintomáticos (144 cães). Foram considerados assintomáticos todos os cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania* e sintomáticos aqueles cães que apresentaram um ou mais sinais clínicos característicos da infecção, entre eles

alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pêlo. Após a realização de exames parasitológicos e sorológicos convencionais, os cães foram divididos em 2 grupos: animais com exames convencionais negativos (**ECN** = 70) e animais com pelo menos um dos exames convencionais positivos (**ECP** = 147). Os cães ECN compreendem aqueles animais com resultados negativos para os exames parasitológicos e sorológicos convencionais - grupo **PNSN** (n = 70, sendo 33 assintomáticos e 37 sintomáticos). Os cães ECP foram estratificados em dois grupos: animais com resultados parasitológicos convencionais negativos e sorológicos positivos - grupo **PNSP** (n= 45, sendo 21 assintomáticos e 24 sintomáticos) e cães com resultados positivos para os exames parasitológicos e sorológicos - grupo **PPSP** (n= 102, sendo 19 assintomáticos e 83 sintomáticos).

2. MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO

Os testes convencionais de diagnóstico da LVC foram previamente realizados no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ como parte da dissertação de mestrado “Comparação de técnicas sorológicas para a identificação da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) visando a otimização do diagnóstico em inquéritos epidemiológicos” (Ferreira, 2005). Os métodos utilizados foram: parasitológicos - exame de lâminas e mielocultura, e sorológicos - Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Teste de Aglutinação Direta (DAT).

2.1. Diagnóstico Parasitológico

Neste estudo foram considerados parasitologicamente positivos os cães que apresentaram pelo menos um dos exames positivo.

2.1.1. Exame de lâminas

Foram confeccionadas lâminas a partir de esfregaço de medula óssea e impressão por aposição do fragmento de pele de orelha. Estas lâminas foram fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa, para a busca de formas amastigotas de *Leishmania*. As leituras foram realizadas por dois microscopistas, considerando-se positivos os resultados em que pelo menos um dos leitores encontrou formas amastigotas.

2.1.2. Mielocultura

As amostras de medula óssea eram armazenadas em geladeira (4°C) durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/ml e penicilina 500U/ml) e uma parte

colocada em meio de cultura NNN (Novy e Mc Nel, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantido à 25° C ± 1°C. O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Se após quatro semanas não fosse observada a presença de promastigotas, o resultado era considerado negativo. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, para posterior caracterização.

2.2. Diagnóstico Sorológico

Foram realizados os testes ELISA, DAT e RIFI. Foram usados como controle soros de 20 cães não infectados (sorologicamente e parasitologicamente negativos) nascidos e criados em canil de experimentação. Cães que foram reativos para pelo menos um dos três testes foram considerados sorologicamente positivos.

2.2.1. ELISA - Ensaio Imunoenzimático

Foi utilizado o Kit EIE-LEISHMANIOSE CANINA - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/RJ. O antígeno utilizado, fixado no fundo das placas são parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*.

Resumidamente, 5 µl das amostras de soro e dos controles positivo e negativo foram diluídas (diluição de 1:100) e homogeneizadas em 500µl do diluente de amostra/conjugado. Picotes de 6 mm das amostras em papel filtro foram colocados em tubos adicionados de 500µl de diluente da amostra/conjugado. Após a diluição ou eluição das amostras, 100µl destas foram distribuídas em placas e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após este intervalo, o conteúdo das placas foi despejado e as placas foram lavadas 6 vezes com o tampão de lavagem. Em seguida adicionou-se 100 µl do

conjugado e as placas foram incubadas novamente à 37°C por 30 minutos. Ao fim deste período, foi removido o conteúdo das placas e elas foram lavadas como anteriormente. O substrato foi distribuído e após incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi bloqueada adicionando-se 50µl de ácido sulfúrico 2M. Em seguida procedeu-se a leitura no leitor de ELISA, da marca "Stat Fax - 2100" / Awareness Technology INC, utilizando-se um filtro de 450 nm.

O ponto de corte foi estabelecido através de um experimento realizado com 20 amostras de cães não infectados de área não endêmica. O valor obtido (0,05 DO) foi utilizado em todos os experimentos posteriores feitos com kits do mesmo lote.

2.2.2. DAT - Direct Agglutination Test

Para a execução do teste de aglutinação direta (DAT) foi utilizado o protocolo descrito por Harith et al (1988) e Meredith et al (1995). As amostras foram diluídas em salina fisiológica (0,9% NaCl) contendo 1,56% de β - mercaptoetanol. Diluições seriadas dos soros foram feitas a partir de 1:100 até a diluição máxima de 1:102.400, ficando a última coluna das placas para os controles positivo e negativo. Em todas as reações foi utilizado o antígeno liofilizado e congelado produzido pelo Royal Tropical Institute (KIT - Amsterdã, Holanda) e gentilmente cedido pelo Dr. Henk Schallig. Cinqüenta microlitros do antígeno (concentração de 5×10^7 promastigotas/mL), diluído em 5mL de solução de cloreto de sódio 0,9% acrescido de 50µL de soro fetal bovino inativado foram adicionados a 50µL do soro diluído. As placas foram cobertas e agitadas levemente. A leitura dos resultados foi feita após 18 horas de incubação à temperatura ambiente. O ponto de corte da reação para soros de cães, estabelecido em estudos prévios, foi de 1:400 (Oskam et al. 1996; Özbel et al. 2000; Schallig et al.

(2002). Soros reativos à diluição > 1:400 foram considerados positivos.

2.2.3. RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

As reações de imunofluorescência indireta foram realizadas utilizando o kit produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/RJ. Dez microlitros de soros diluídos a partir de 1:40 até 1:640 foram

3. MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO

Técnicas de biologia molecular foram empregadas neste estudo com o objetivo de diagnosticar a infecção por *Leishmania*, identificar a espécie e por fim quantificar a carga de DNA do parasito em amostras clínicas de sangue e medula. Para a detecção de *Leishmania* nas amostras clínicas dos cães foi empregada uma PCR convencional que amplifica um fragmento da região conservada do kDNA de tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* (figura 1). A técnica RFLP associada à PCR foi utilizada para identificar a espécie de *Leishmania* presente nas amostras. Finalmente, foi padronizado um ensaio de PCR em tempo real que quantifica os níveis de DNA do parasito em amostras biológicas provenientes de cães.

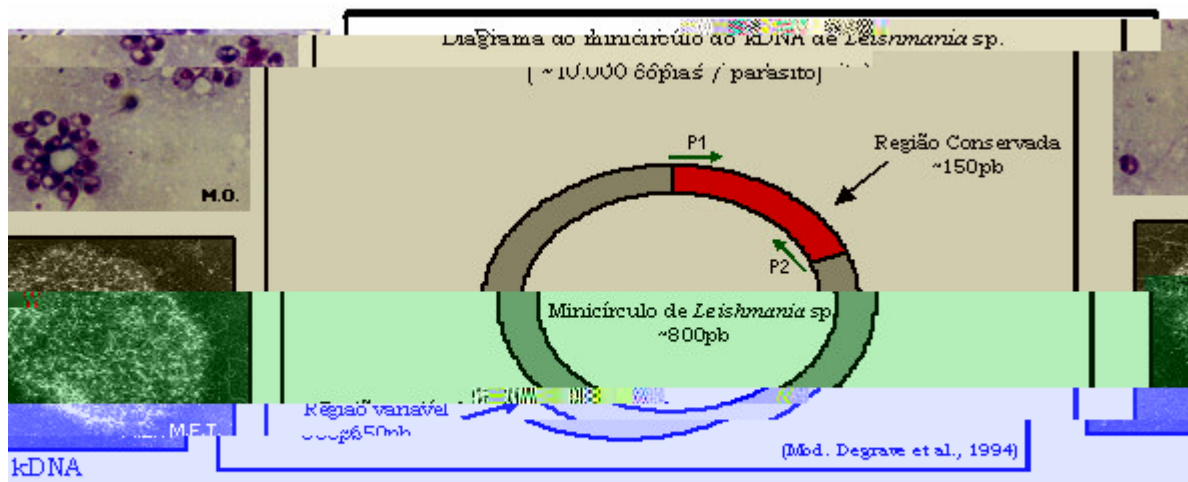


Figura 1 - Formas amastigota de *Leishmania* mostrando a localização do cinetoplasto e diagrama esquemático do minicírculo do kDNA, com as regiões variável e conservada. As setas indicam o local aproximado do anelamento dos primers 1 e 2.

3.1. Cultivo e lavagem de promastigotas de *Leishmania*

Alíquotas das cepas de referência das espécies *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) i. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram

retiradas do criobanco do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ para serem utilizadas como controles positivos nas reações de PCR. Após descongelamento, as formas promastigotas foram cultivadas em meio agar-sangue, NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) associado ao meio líquido LIT (Liver Infusion Tryptose). As culturas foram mantidas em estufa BOD à $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, durante um período de cinco a seis dias. A cada seis dias as culturas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação por outros microrganismos. Além disso, os parasitos eram repicados transferindo-se uma alíquota de aproximadamente $500\mu\text{L}$ do meio líquido para um novo tubo de cultura contendo $500\mu\text{L}$ NNN/LIT. Após algumas passagens, quando a cultura atingiu a concentração de 1×10^8 promastigotas/mL, procedeu-se à lavagem das massas para posterior extração do DNA.

Os parasitos foram transferidos para tubos falcon de 15mL, lavados três vezes com PBS pH 7,2 estéril e centrifugado por 10 minutos à 4°C a 3.000 r.p.m. Em seguida, essa massa foi estocada em freezer -20°C até sua utilização.

3.2. Extração de DNA das massas de promastigotas

O método do fenol-clorofórmio foi utilizado, seguindo o seguinte procedimento: os parasitos estocados foram retirados do freezer -20°C e após o descongelamento as células foram ressuspensas em solução de lise (SDS 1%, 50mM EDTA, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0) contendo $60\mu\text{g/ml}$ de proteinase K. Os tubos foram incubados em banho-maria a 52°C por 1 hora. Após este período, adicionou-se igual volume de fenol neutralizado pH 8,0 e homogeneizando por 10 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 8.000 r.p.m. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 volume de fenol e 0,5 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Agitou-se e centrifugou-se como antes. Novamente a fase

aquosa foi transferida para um novo tubo contendo igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico, seguida de agitação e centrifugação.

Para a precipitação do DNA foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2. Os tubos foram incubados em freezer -20°C "overnight" e depois foram centrifugados por 10 minutos a 4°C a 8.000 r.p.m.

Os tubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol. Depois de seco, os DNAs foram ressuspensos em água deionizada e após um tempo de hidratação à temperatura ambiente, foram estocados em freezer -20°C até a utilização.

Para utilização como controles positivos nas reações de PCR, o DNA extraído foi dosado e diluído em água para a concentração de 1ng/ μ L.

3.3. Extração de DNA das amostras clínicas

As amostras clínicas de sangue, medula óssea e pele foram retiradas do freezer -20°C e descongeladas à temperatura ambiente alguns minutos antes da extração. Para o isolamento do DNA desses tecidos, foram utilizados kits comerciais apropriados, pelo fato de conferirem maior pureza ao DNA extraído.

3.3.1. Sangue periférico total e medula óssea

Para a extração do DNA de amostras de sangue periférico total e medula óssea foi utilizado o Kit de Cromatografia em Coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (AMERSHAM BIOSCIENCES). Resumidamente, as amostras foram lisadas com a solução RBC (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, 0,1mM EDTA); após centrifugação, o sedimento contendo as células brancas foi incubado com a solução de extração. A mistura foi transferida para coluna GFX e novamente centrifugada. Após adicionar a solução de lavagem (tampão Tris-

EDTA adicionado de etanol absoluto), o DNA foi eluído da coluna com água destilada e deionizada aquecida à 65°C e estocado à -20°C até o uso.

3.3.2. Pele

A extração do DNA a partir de amostras de pele foi feita utilizando o Kit Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (AMERSHAM BIOSCIENCES), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Brevemente, fragmentos de 10 - 20 mg do tecido foram mergulhados em solução de lise adicionada de proteinase K na concentração de 20µg/ml, exaustivamente triturados com o auxílio de um pistilo descartável e incubados a 55°C por 12 horas. Após a precipitação das proteínas por centrifugação, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para um novo tubo contendo etanol 100% e centrifugado para a obtenção de um precipitado branco de DNA. O etanol foi descartado e depois de os tubos estarem bem secos, efetuou-se a hidratação do DNA com água destilada e deionizada, o qual foi armazenado à -20°C até sua utilização.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Duas reações de PCR convencional foram realizadas nas amostras clínicas de pele, sangue e medula óssea: a primeira para detectar a presença de DNA de *Leishmania*, e assim, diagnosticar os cães positivos para LV; a segunda para avaliar se o passo de extração do DNA foi bem sucedido. Nesta última reação foram utilizados iniciadores que amplificam o gene constitutivo β globina do cão. Esta reação de PCR para controle da qualidade do DNA foi realizada somente nas amostras negativas na PCR para detectar o parasito.

3.4.1. PCR para o gênero *Leishmania*

O par de iniciadores utilizado foi previamente desenhado para o gênero *Leishmania* a partir da região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito: primer A: 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e primer B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave et al. 1994), que amplifica um fragmento de 120 pb. As reações foram preparadas para um volume final de 25µl contendo 2µl de DNA, solução tampão 10x - 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 200µM dNTPs, 10pmoles de cada iniciador e 1,25 U de Taq DNA polimerase (AMERSHAM BIOSCIENCES).

A amplificação foi feita em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-Geneamp PCR System 2400) utilizando o seguinte programa: 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

3.4.2. PCR para amplificação do gene β globina

Com o objetivo de avaliar a extração de DNA das amostras clínicas utilizadas, foi efetuada a amplificação de um fragmento do gene constitutivo do cão que codifica a subunidade protéica β globina da proteína transportadora de oxigênio em mamíferos, a Hemoglobina, a qual é composta de duas cadeias protéicas alfa (α) e duas cadeias beta (β). Os iniciadores utilizados nessa PCR foram os seguintes: β globina: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' e β globina 01: 5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'. Uma mistura contendo 200µM de cada dNTP em uma solução tampão 10x com 100mM Tris-HCL (pH 8,0), 1,5 mM de MgCl₂ e 50 mM de KCL; 10 pmoles de cada primer e 2U de Taq DNA polimerase foi completada com 2,0 µl de DNA, de forma a obter um volume final de 20 µl.

A reação foi realizada no termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneampPCRSistem 2400) e as condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão. No último ciclo a extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Esse passo foi realizado para comprovar se a etapa de extração de DNA foi bem sucedida, de forma a assegurar que as amostras negativas na PCR para o gênero *Leishmania* não estavam mesmo infectadas pelo protozoário. Assim, as amostras positivas na PCR β globina foram consideradas amostras clínicas válidas, ou seja eram de cães não-infectados, já as amostras que foram PCR β globina negativas foram excluídas do estudo.

3.4.3. Visualização dos resultados

Os produtos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizados após coloração por nitrato de prata a 0,2%. Foram aplicados no gel 10 μ l de cada amostra (5 μ l do material amplificado + 5 μ l do corante). O marcador de peso molecular utilizado foi o ϕ x174, digerido por Hae III, apresentando 11 fragmentos variando de 72 a 1357 pb.

4. PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE *LEISHMANIA*

A técnica RFLP ou polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição utiliza enzimas de restrição que cortam a dupla-fita do DNA pelo reconhecimento de uma pequena seqüência de nucleotídeos, usualmente de 4 a 6 pares de bases de tamanho. O kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) i. chagasi* apresentam seqüências suficientemente distintas para ser utilizado na separação destas espécies. Segundo Volpini (2003), a digestão com a endonuclease Hae III possibilita a distinção das três espécies, entretanto a enzima ApaL I diferencia apenas os complexos *Leishmania* e *Viannia*. A variabilidade dos tamanhos de fragmentos obtidos após a digestão é mostrada na tabela 1.

Tabela 1 - Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) i. chagasi*.

Espécie	Enzima de Restrição	
	Hae III	ApaL I
	Tamanho dos fragmentos após digestão (pb)	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	116	116
<i>L. (V.) braziliensis</i>	80, 40	88 e 32
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	120, 80, 60 e 40	120

Para a identificação da espécie de *Leishmania* nas amostras de cães infectados foi utilizada a enzima Hae III. A PCR-RFLP do kDNA de *Leishmania* foi realizada de acordo com protocolo proposto por Volpini et al. 2004. Resumidamente, 5 µl de produto de PCR obtido com os iniciadores A e B foram digeridos através da adição de 1U da enzima de restrição Hae III e o seu tampão apropriado

(1x). A mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. Os fragmentos de restrição foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e visualizados após coloração por nitrato de prata.

Os fragmentos de restrição obtidos pela digestão do DNA das amostras clínicas foram comparados com o perfil gerado após a digestão de DNA das cepas referência para cada espécie de *Leishmania*: *L. amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (M2903) e *L. i. chagasi* (PP75).

5. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE *LEISHMANIA*

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é uma metodologia que utiliza marcadores fluorescentes e um sistema óptico eletrônico que capta e avalia a emissão de fluorescência permitindo o monitoramento contínuo dos produtos de PCR formados a cada ciclo da reação. O sistema de detecção com “intercaladores” não-específicos da dupla-fita de DNA foi empregado nos experimentos. O “intercalador” SYBR Green (APPLIED BIOSYSTEMS) fluoresce fortemente quando ligado à dupla-fita de DNA, mas tem fluorescência mínima quando está livre em solução.

Curvas padrão foram utilizadas para cada experimento de quantificação utilizando quantidades conhecidas dos plasmídeos contendo os genes de interesse clonados. Assim, foi necessário clonar os produtos de PCR do gene β globina de cão e do fragmento de 120 pb da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*, conforme abaixo descrito.

5.1. Clonagem dos fragmentos dos genes do kDNA e β globina

Os produtos de PCR dos fragmentos dos genes do kDNA de *Leishmania* e β globina do cão foram clonados no vetor TOPO pCR 2.1 (INVITROGEN), (figura 2), conforme especificação do fabricante.

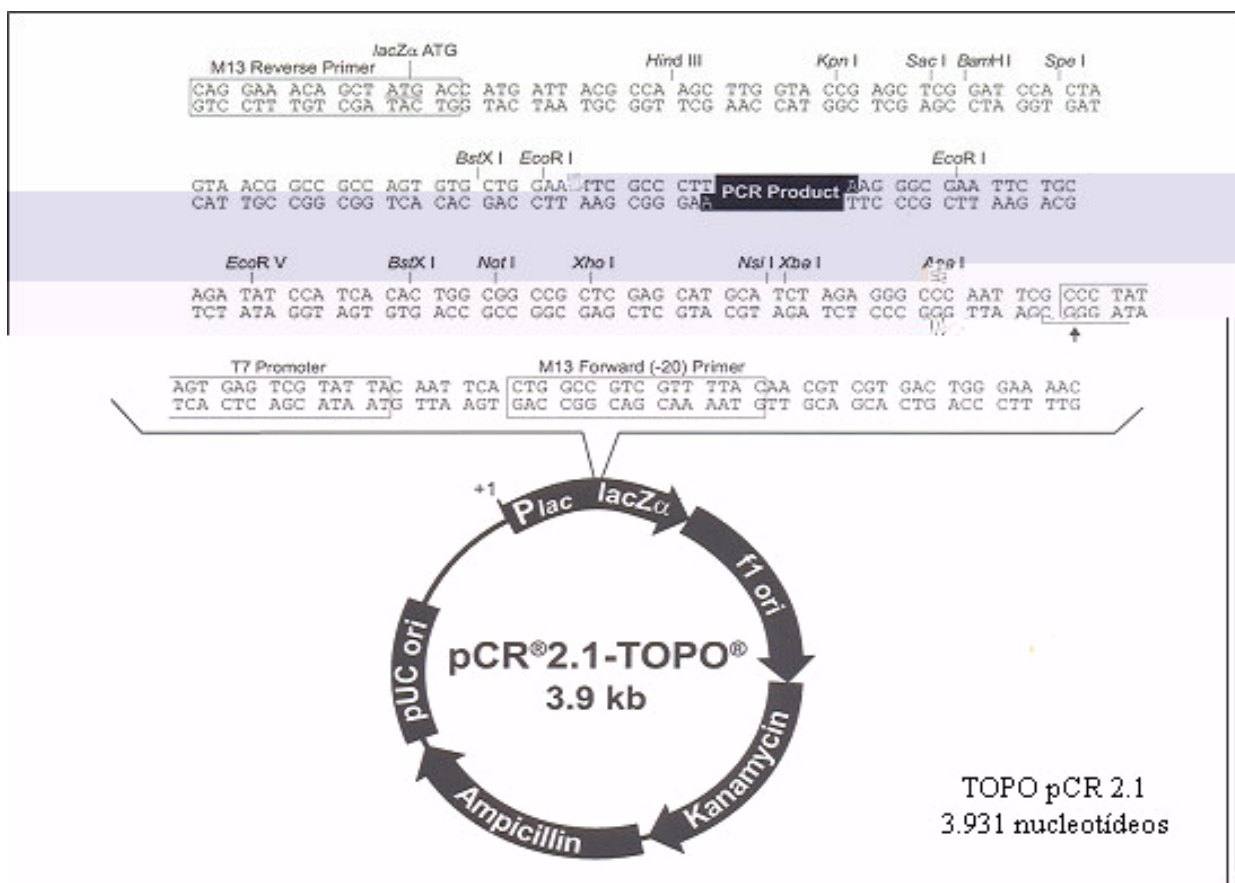


Figura 2 - Mapa mostrando as características do vetor TOPO pCR 2.1 e a seqüência em torno do sítio de clonagem. Os sítios de restrição estão marcados para indicar o local exato de clivagem. As setas indicam o início da transcrição pela T7 polimerase.

Resumidamente, 4 µl do produto de PCR, 1µl do tampão de reação (4x) e 1µl do vetor defosforilado contendo T (timina) na extremidade 3' foram incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, todo o volume da reação foi incubado no gelo com 70 µl da bactéria *Escherichia coli* da linhagem TOP 10 F' cálcio competente, durante 30 minutos. A transformação da *E. coli* foi feita por choque térmico à 42°C durante 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico e o tubo incubado à 37°C por 1 hora com agitação. Após este período, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar com 100µg/ml de ampicilina e incubadas à 37°C durante 12h. As colônias de bactérias foram submetidas a PCR com os iniciadores

específicos para o gene de interesse, para a confirmação da clonagem (figura 3). Após confirmação, as bactérias foram crescidas em meio LB com 100µg/ml de ampicilina, à 37°C com agitação durante 12h. Posteriormente, submeteu-se o sedimento das bactérias à extração de plasmídeo utilizando o Kit mini-prep (QIAGEN), conforme protocolo do fabricante. Os plasmídeos contendo os genes de interesse foram dosados e diluídos (10^4 a 10^8 moléculas) para serem utilizados como curva padrão no qPCR.

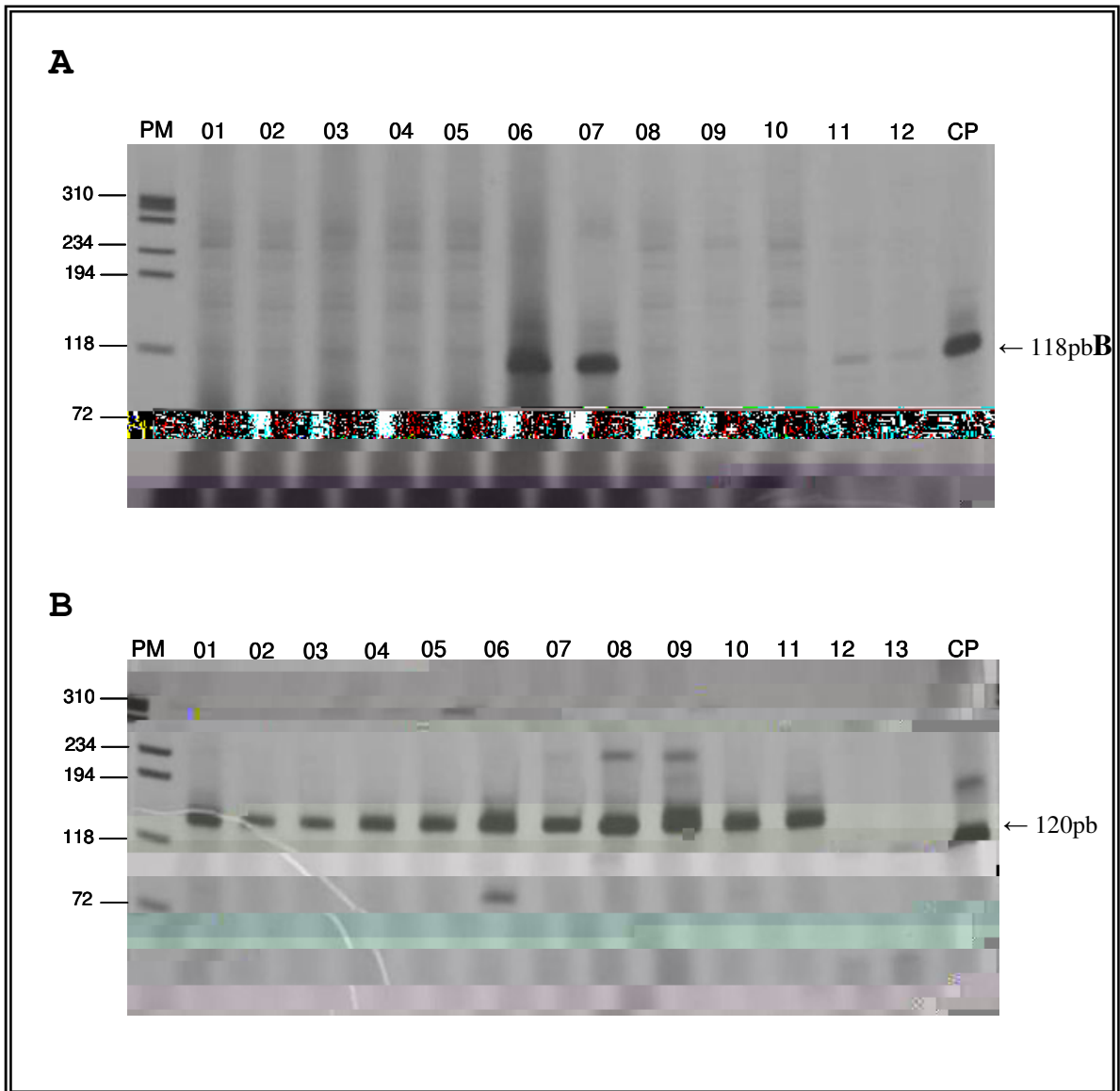


Figura 3 - Fragmentos de 118pb do gene β globina do cão (A) e de 120pb do kDNA de *Leishmania* (B), amplificados a partir de DNA extraído de colônias bacterianas contendo os plasmídeos recombinantes. PM - marcador de peso molecular ϕ X 174 digerido por Hae III; 1 a 13 - diferentes colônias de bactérias contendo os genes clonados; CP - controles positivos: DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania* (A) e sangue de cão não infectado proveniente do canil da UFOP, Ouro Preto (B).

5.2. PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR)

PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* presente nas diferentes amostras clínicas. Foram selecionados 35 cães com resultados positivos na PCR convencional, sendo 11 pertencentes ao grupo PNSN, 9 animais ao grupo PNSP e 15 ao grupo PPSP. Destes, 21 eram assintomáticos e 14 sintomáticos. O DNA extraído das amostras de sangue e medula foi submetido a amplificação e quantificação das cópias do fragmento de 120pb do kDNA de *Leishmania*. A amplificação foi realizada pelo Sistema de Detecção da Sequência Gene-Amp 5700 (PE Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados foram os mesmos da PCR convencional: primers A e B. O gene constitutivo β globina do cão foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada, utilizando os iniciadores β globina e β globina 01.

As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR Green (Applied Biosystems), 25 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerase, 5 μ l de DNA e água deionizada para completar o volume final da reação de 25 μ l. O corante SYBR Green intercala na dupla fita de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Após aplicar as amostras, a placa foi vedada com um selante e colocada no equipamento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 94°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. Curvas-padrão foram utilizadas para cada experimento utilizando quantidades conhecidas (diluições seriadas ao décimo) dos plasmídeos TOPO pCR 2.1 (INVITROGEN) com os genes de interesse clonados. Os genes recombinantes do cão, β globina de 118pb e do parasito, kDNA de 120pb, foram utilizados como

controles da reação para garantir a especificidade das reações de qPCR. Os resultados foram analisados utilizando o programa "Sequence Detection System" (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e quantificar o número de cópias conforme a curva padrão.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico MINITAB versão 13. As diferenças das frequências de positividade em cada teste, as análises de comparação das diferentes amostras clínicas empregadas na PCR e também a comparação entre os grupos clínicos foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) e Comparações múltiplas pela metodologia de Bonferroni. Os resultados da quantificação de moléculas de kDNA de *Leishmania* através do qPCR foram analisados pelo Teste T Student, Teste T pareado, ANOVA e Comparações múltiplas de Tukey. Os valores foram previamente transformados em logaritmos naturais (Ln) para obtenção de uma distribuição normal. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.



RESULTADOS

Um total de 217 amostras de pele, sangue e medula óssea foi submetido à PCR convencional para detecção de parasitos do gênero *Leishmania*. Dentre elas, 194 amostras de cães positivos na PCR convencional foram submetidas à PCR-RFLP para identificação da espécie de *Leishmania*; 35 amostras de sangue e 35 de medula ao qPCR para quantificação da carga de DNA do parasito.

1. PCR CONVENCIONAL PARA O GÊNERO *LEISHMANIA*

Considerando a aplicabilidade da PCR, foi avaliada a sensibilidade desta técnica na busca por uma ferramenta alternativa para a detecção segura de *Leishmania* em diferentes tecidos de cães. Diferentes maneiras de avaliar a performance da PCR foram abordadas: determinação da concentração mínima de DNA necessária para que o método consiga detectar a presença do parasito; comparação da eficácia de diferentes amostras biológicas como fonte de DNA nas reações de amplificação; comparação do desempenho da PCR em relação a métodos convencionais de diagnóstico (sorológico e parasitológico); avaliação do desempenho da PCR no diagnóstico da LV em cães com diferentes formas clínicas e agrupados de acordo com resultados dos exames convencionais.

1.1. Avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR

Inicialmente, buscou-se determinar a concentração mínima de DNA de *Leishmania* necessária para visualização de uma banda positiva após revelação em gel de poliacrilamida. A partir desse valor, foi estabelecida a concentração de DNA do parasito seria utilizada como controle positivo das reações de PCR.

Com o objetivo de estimar a sensibilidade dos ensaios de PCR utilizando os iniciadores A e B (Degrave et al. 1994), diluições seriadas de DNA purificado de formas promastigotas de *L. i. chagasi* foram submetidas à reação de amplificação. Foram

feitas diluições seriadas de 10x a partir da concentração de 1ng de DNA por microlitro de água até 0,0001fg de DNA/ μ L. A figura 4 mostra o perfil de bandas encontrado após a amplificação. Foi possível verificar a presença do fragmento de 120pb até a canaleta oito, que corresponde à concentração igual a 0,1fg DNA/ μ l.

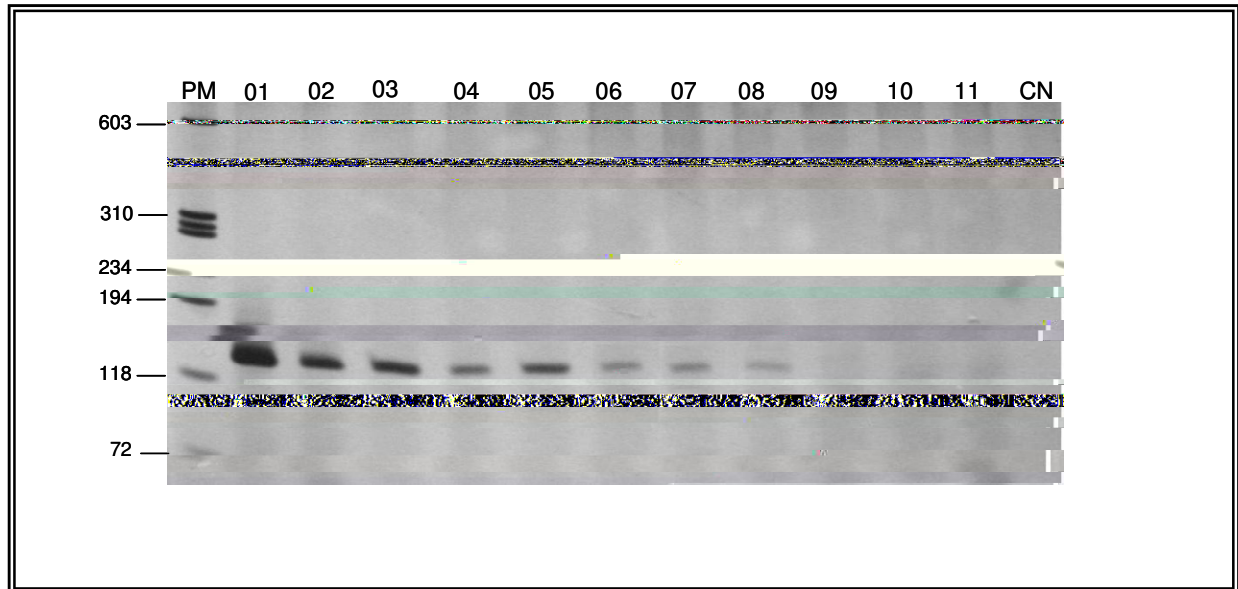


Figura 4 - Perfil de bandas gerado após a amplificação de diluições seriadas de DNA purificado de promastigotas de *L. (L.) chagasi* com os iniciadores A e B. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. PM - marcador de peso molecular ϕ X-174 digerido por Hae III; 1- 1ng de DNA de *Leishmania*/ μ l; 2- 0,1ng/ μ l; 3- 0,01 ng/ μ l; 4- 0,001 ng/ μ l (1 pg/ μ l), 5- 0,1 pg/ μ l; 6- 10,0 fg/ μ l; 7- 1,0 fg/ μ l; 8- 0,1 fg/ μ l; 9- 0,01 fg/ μ l; 10- 0,001 fg/ μ l; 11- 0,0001 fg/ μ l; CN - controle negativo (sem DNA).

1.2. Eficácia de diferentes amostras clínicas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

Com o objetivo de avaliar o ensaio de PCR para a detecção de DNA de *Leishmania* em material biológico, foi utilizado DNA extraído de amostras de pele, sangue e medula de 217 cães. As amostras negativas nestas reações foram submetidas a amplificação

de um fragmento de DNA presente em um gene constitutivo de mamíferos que codifica a subunidade protéica β globina para avaliar se a etapa de extração de DNA foi bem sucedida. As amostras negativas foram excluídas das análises. Assim, o número de amostras clínicas utilizadas, bem como a porcentagem de PCR positiva para cada tecido estão representados na tabela 2.

Medula óssea e pele foram as amostras clínicas mais adequadas para a detecção de DNA de *Leishmania* através da PCR. A PCR utilizando amostras de medula apresentou positividade de 85% e utilizando sangue, aproximadamente 75%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,017$). Entretanto, quando comparadas as amostras de medula e pele bem como de pele e sangue, não houve diferença no índice de positividade da PCR ($p = 0,220$ e $0,234$, respectivamente).

A análise da eficácia da PCR considerando os diferentes tecidos dos cães assintomáassintománãs 00(amouando)-10()600 diferenç1

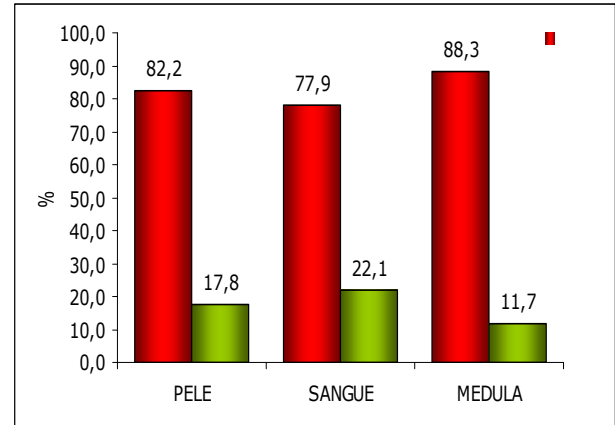


Figura 5 - Comparação entre a proporção de positivos nas diferentes amostras clínicas coletadas de cães provenientes de área endêmica do município de Belo Horizonte. **A - cães assintomáticos** ($p = 0,548$), **B - cães sintomáticos** ($p = 0,084$).

1.3. Desempenho da PCR para o diagnóstico da LV em cães assintomáticos e sintomáticos

A PCR foi positiva em pelo menos uma das amostras clínicas em 69 dos 73 cães assintomáticos e em 142 dentre os 144 sintomáticos. A comparação (figura 6) mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos de animais ($p = 0,083$). Esses resultados demonstram que a PCR é um bom método para o diagnóstico da leishmaniose em cães que apresentam quadro clínico diferente.

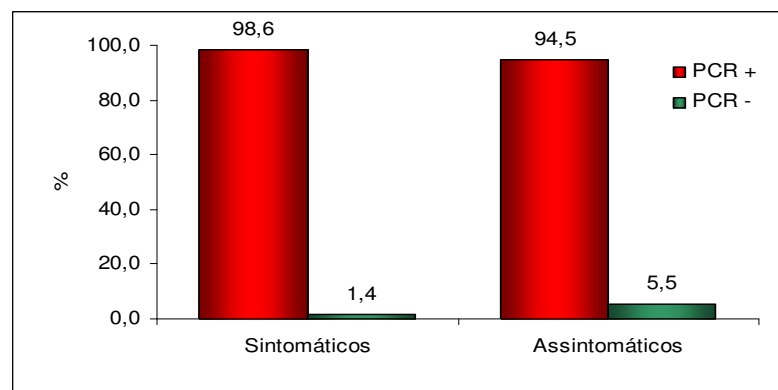


Figura 6 - Porcentagem de cães assintomáticos e sintomáticos positivos para a PCR em pelo menos um dos tecidos avaliados ($p = 0,083$).

A PCR utilizando as amostras clínicas pele, sangue e medula foi igualmente apta para a detecção de *Leishmania* independente do quadro clínico dos cães avaliados. A comparação entre o número de positivos na PCR para cada um dos tecidos não mostrou diferença significativa entre o grupo dos sintomáticos e dos assintomáticos (figura 7).

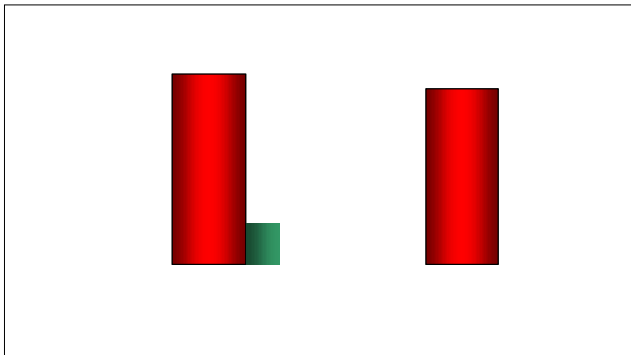


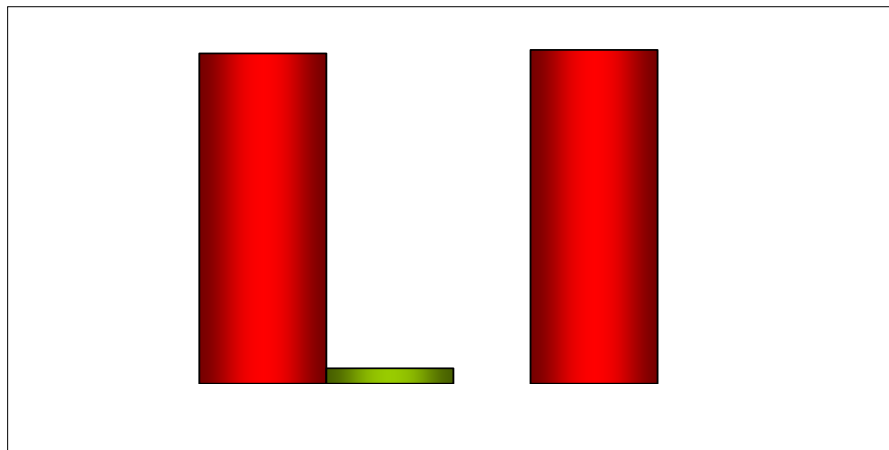
Figura 7 - Comparação da porcentagem de cães positivos na PCR das amostras pele ($p = 0,305$), sangue ($p = 0,234$) e medula ($p = 0,064$) entre os grupos clínicos sintomáticos e assintomáticos.

1.4. Desempenho da PCR para o diagnóstico da LV em cães agrupados de acordo com os resultados de exames convencionais

Após a realização de exames parasitológicos e sorológicos convencionais os cães foram divididos em dois grupos: animais com exames convencionais negativos (**ECN**) e animais com pelo menos um dos exames convencionais positivos (**ECP**). Os cães ECN compreendem aqueles animais com resultados negativos para os exames parasitológicos e sorológicos convencionais- grupo **PNSN** ($n= 70$),

e os cães ECP são os animais com resultados parasitológicos convencionais negativos e sorológicos positivos - grupo **PNSP** (n= 45) ou os cães com resultados positivos para os exames parasitológicos convencionais e sorológicos - grupo **PPSP** (n= 102).

No grupo **ECN**, 95,7% dos cães apresentaram PCR positiva em pelo menos uma amostra clínica. No grupo **ECP**, aproximadamente 97% dos cães foram PCR positivos. A figura 8 mostra que não houve diferença significativa na proporção de cães infectados por *Leishmania* detectados por PCR entre os dois grupos ($p = 0,747$).



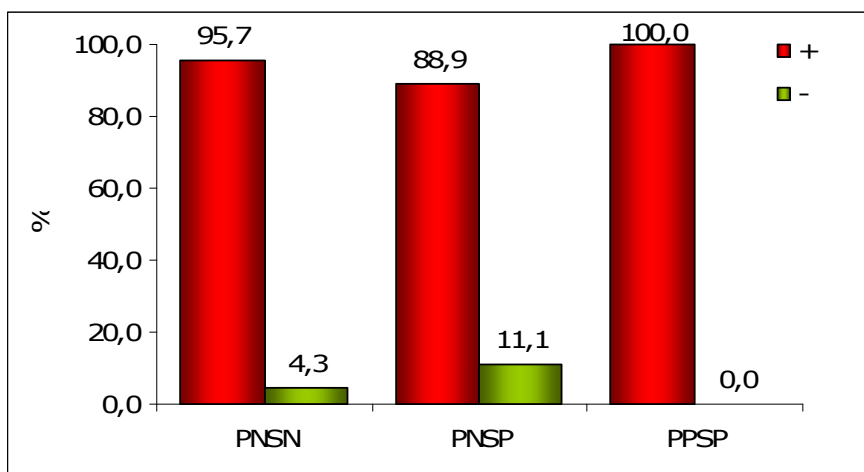


Figura 9 - Porcentagem de cães positivos para a PCR em pelo menos um dos tecidos no grupo de animais PNSN, PNSP e PPSP ($p = 0,004$).

2. COMPARAÇÃO ENTRE A PCR E OS MÉTODOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO CONVENCIONAIS

A tabela 3 mostra os resultados de exames sorológicos, parasitológicos convencionais e PCR realizados em cães sintomáticos e assintomáticos para leishmaniose visceral.

Tabela 3 – Resultados de exames sorológicos, parasitológicos convencionais e PCR realizados em 217 cães, provenientes de área endêmica do município de Belo Horizonte, de acordo com o quadro clínico.

		SOROLÓGICO	PARASITOLÓGICO	PCR		
				Pele	Sangue	Medula
SINTOMÁTICOS	+	107 (74,3%)	83 (57,6%)	111 (82,2%)	102 (77,8%)	113 (88,3%)
	-	37 (25,7%)	61 (42,4%)	24 (17,8%)	29 (22,2%)	15 (11,7%)
	TOTAL	144	144	135	131	128
ASSINTOMÁTICOS	+	40 (54,8%)	19 (26,0%)	51 (76,1%)	47 (70,1%)	50 (78,1%)
	-	33 (45,2%)	54 (74,0%)	16 (23,9%)	20 (29,9%)	14 (21,9%)
	TOTAL	73	73	67	67	64
TOTAL		217	217	202	198	192

Dentre os 37 animais sintomáticos com sorologia negativa, foram detectados 36 positivos em alguma PCR, o que corresponde a 97% de falso-negativos (tabela 4). Dos 61 que apresentaram exames parasitológicos convencionais negativos, 58 (96%) foram positivos na PCR.

Dos 33 cães assintomáticos com exames sorológicos negativos, 31 foram positivos na PCR, ou seja, 93% eram sorologicamente falso-negativos (tabela 4). E dos 54 com exames parasitológicos convencionais negativos, 48 foram PCR positivos, o que corresponde a 88% de falso-negativos.

Tabela 4 – Resultados da PCR nos grupos de animais com sorologia negativa e positiva separados de acordo com o quadro clínico.

		SINTOMÁTICOS			ASSINTOMÁTICOS			
		SOROLOGIA		TOTAL	SOROLOGIA		TOTAL	
		+	-		+	-		TOTAL
PCR	+	107	36	143	38	31	69	212
	-	00	01	01	02	02	04	05
TOTAL		107	37	144	40	33	73	217

A comparação dos resultados dos testes sorológicos entre os cães sintomáticos e assintomáticos mostrou que houve diferença na proporção de animais positivos entre os grupos clínicos ($p = 0,004$). Nos cães sintomáticos para LV a proporção de testes sorológicos positivos foi significativamente maior (figura 10).

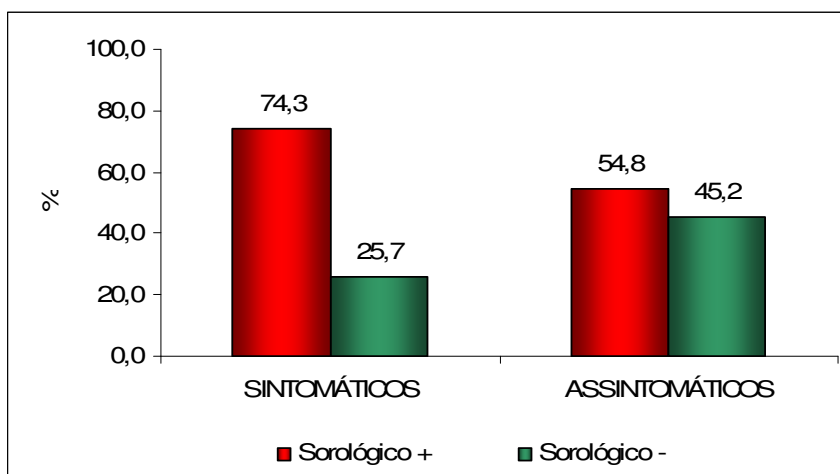


Figura 10 - Comparação dos resultados de testes sorológicos entre os cães sintomáticos e assintomáticos mostrando a diferença na proporção de cães com sorologia positiva entre os grupos clínicos ($p = 0,004$).

Em relação aos exames parasitológicos convencionais, a proporção de cães positivos também foi significativamente diferente entre os grupos clínicos ($p = 0,000$). A figura 11

mostra que entre os cães sintomáticos houve maior número de resultados positivos.

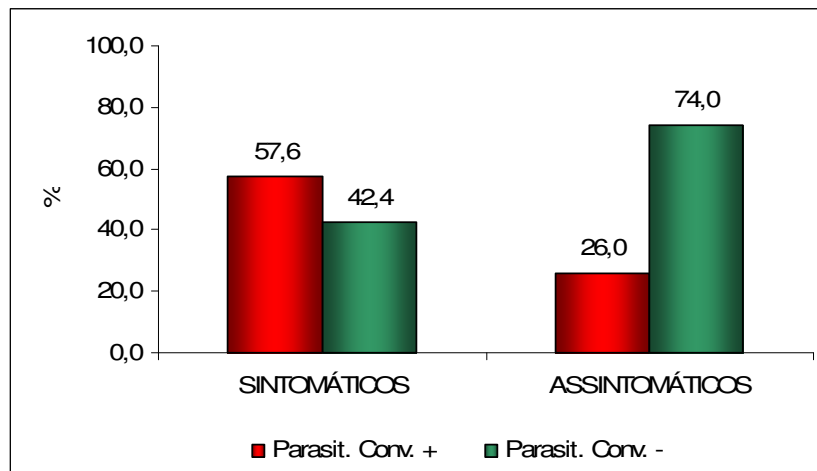


Figura 11 - Comparação dos resultados de testes parasitológicos convencionais entre os cães sintomáticos e assintomáticos mostrando a diferença na proporção de cães positivos entre os grupos clínicos ($p = 0,000$).

A comparação dos testes sorológicos, parasitológicos convencionais e PCR mostrou que houve diferença significativa na sensibilidade entre os três métodos de diagnóstico ($p = 0,000$), sendo que a PCR mostrou ser o melhor método para detecção da infecção nos cães avaliados e o parasitológico convencional o pior (figura 12).

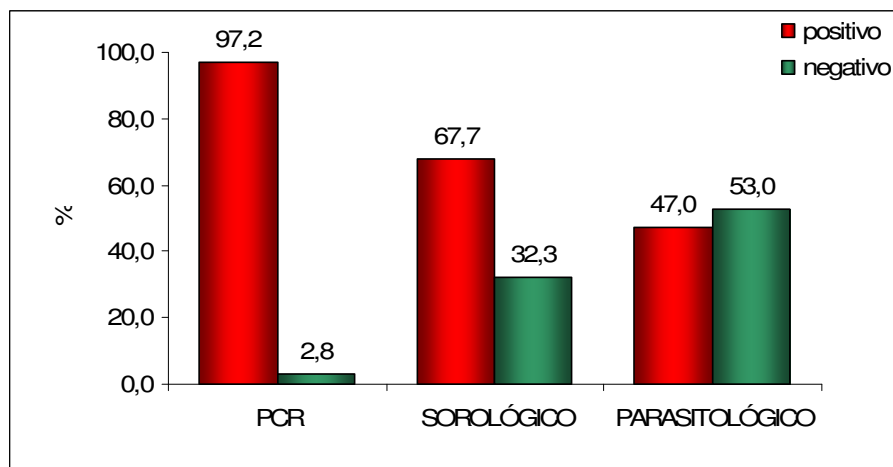


Figura 12 - Comparação da proporção de positivos entre os três diferentes métodos diagnósticos testados ($p = 0,000$).

3. AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE A PCR E OS MÉTODOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO CONVENCIONAIS

O índice *kappa* informa a proporção de concordâncias além da esperada pela chance e seu valor varia de “menos 1” (completo desacordo) a “mais 1” (concordância total). A tabela 3 mostra a concordância entre a PCR, a sorologia e o parasitológico convencional. Comparando a PCR e a sorologia o teste *kappa* evidenciou que houve concordância ruim entre os testes ($k = 0,00$). Quando a PCR foi comparada ao método parasitológico convencional o valor do *kappa* foi um pouco melhor ($k = 0,049$), contudo, ainda assim a concordância foi considerada fraca.

Se considerarmos que os animais positivos na PCR são os verdadeiramente infectados, notamos que dentre os 70 cães negativos na sorologia, 68 eram falso-negativos. E dos 115 parasitologicamente negativos, somente 7 eram verdadeiramente negativos. A concordância entre os métodos foi ruim devido ao grande número de cães com exames sorológicos e parasitológicos negativos que foram positivos na PCR.

Tabela 5 - Concordância entre a PCR e os métodos sorológico e parasitológico convencionais utilizados para o diagnóstico da LVC.

PCR	SOROLOGIA		PARASITOLÓGICO CONVENCIONAL	
	+	-	+	-
+	142	68	102	108
-	05	02	00	07
TOTAL	147	70	102	115
<i>kappa</i>	$k = 0,00$		$k = 0,049$	

4. IDENTIFICAÇÃO DA(S) ESPÉCIE(S) DE *LEISHMANIA* ATRAVÉS DA PCR-RFLP

Os produtos amplificados a partir de amostras pele, medula e sangue de cães positivos na PCR convencional e de cepas referência de *Leishmania* (controles positivos) foram digeridos pela enzima de restrição Hae III. A enzima de restrição Hae III digere o produto de PCR de 120pb da *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, um de 80pb e outro de 40pb, mas não digere o produto amplificado de *L. (L.) amazonensis*. Por outro lado, a digestão desse amplicon de *L. (L.) i. chagasi* com essa mesma enzima gera um perfil com 4 bandas distintas de 120, 80, 60 e 40pb (figura 13).

Através da PCR-RFLP, conseguimos identificar a espécie de *Leishmania* presente em 194 dos 212 cães PCR positivos. Encontramos *L. braziliensis* na amostra de sangue de um cão e na medula de outro. Nos outros 192 animais as amostras submetidas à digestão foram identificadas como *L. i. chagasi* (146 amostras de pele, 44 de medula e 2 de sangue). Em 18 cães não foi possível caracterizar a espécie de *Leishmania*.

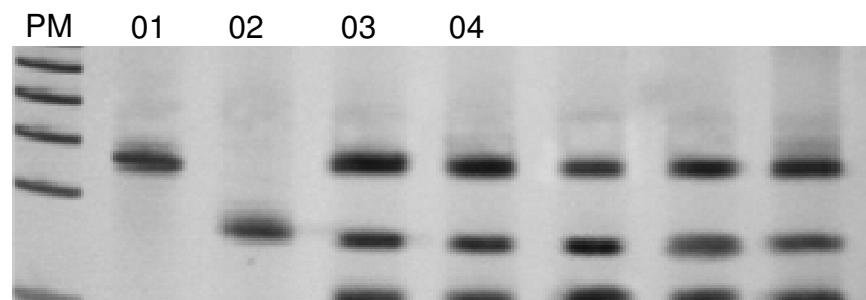


Figura 13 - Fragmentos de restrição gerados após digestão dos amplicons de 120pb da região conservada do kDNA de *Leishmania* pela enzima Hae III. Gel de poliacrilamida 10% corado pela prata. PM: padrão de peso molecular 50pb; 01- *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), 02- *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), 03- *L. i. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); 04 a 07 produtos amplificados a partir de DNA extraído de pele.

5. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE *LEISHMANIA* ATRAVÉS DO qPCR

5.1. Avaliação da especificidade dos iniciadores e estabelecimento das curvas-padrão para os genes kDNA e β -globina

PCR quantitativo em tempo real das amostras de sangue e medula dos cães foi utilizado com o objetivo de comparar a carga parasitária em diferentes tecidos do mesmo animal e verificar se existe alguma associação entre a densidade de parasitos e a forma clínica da doença. Inicialmente foi obtida uma curva padrão utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos da região conservada do kDNA de *Leishmania* e da β globina do cão (10^4 a 10^7 cópias - figura 11A) clonados no vetor TOPO pCR2.1. Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional à quantidade de DNA, foi expressa pelo valor do ciclo da PCR tomando como base de análise o *cycle threshold* (C_T). Observamos que ambas as curvas apresentaram uma linearidade satisfatória, com os valores de r^2 próximos de 1 ($r^2 = 0,9938$ para o kDNA de *Leishmania* e $0,9806$ para a β globina) para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testados.

O SYBR Green é um corante fluorogênico que se liga a qualquer dupla-fita de DNA, detectando não apenas as fitas de DNA alvo, mas também produtos de PCR inespecíficos e dímeros de primers. Os gráficos da dissociação temperatura-dependente desse corante para os produtos de PCR do kDNA e β globina revelaram que a fluorescência foi emitida apenas em uma temperatura, demonstrando que só um produto de PCR foi gerado em cada reação. A figura 14 mostra a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes do kDNA de *Leishmania* e da β globina de cão para as amostras de sangue (B) e para as amostras de medula (C), evidenciando um único pico,

mostrando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene. A quantidade de cópias do fragmento de 120pb do kDNA para as diferentes amostras foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do C_T da curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos do kDNA. A medida do número de cópias do kDNA foi normalizada pela comparação com aquela obtida para o gene constitutivo de cópia única β globina do cão.

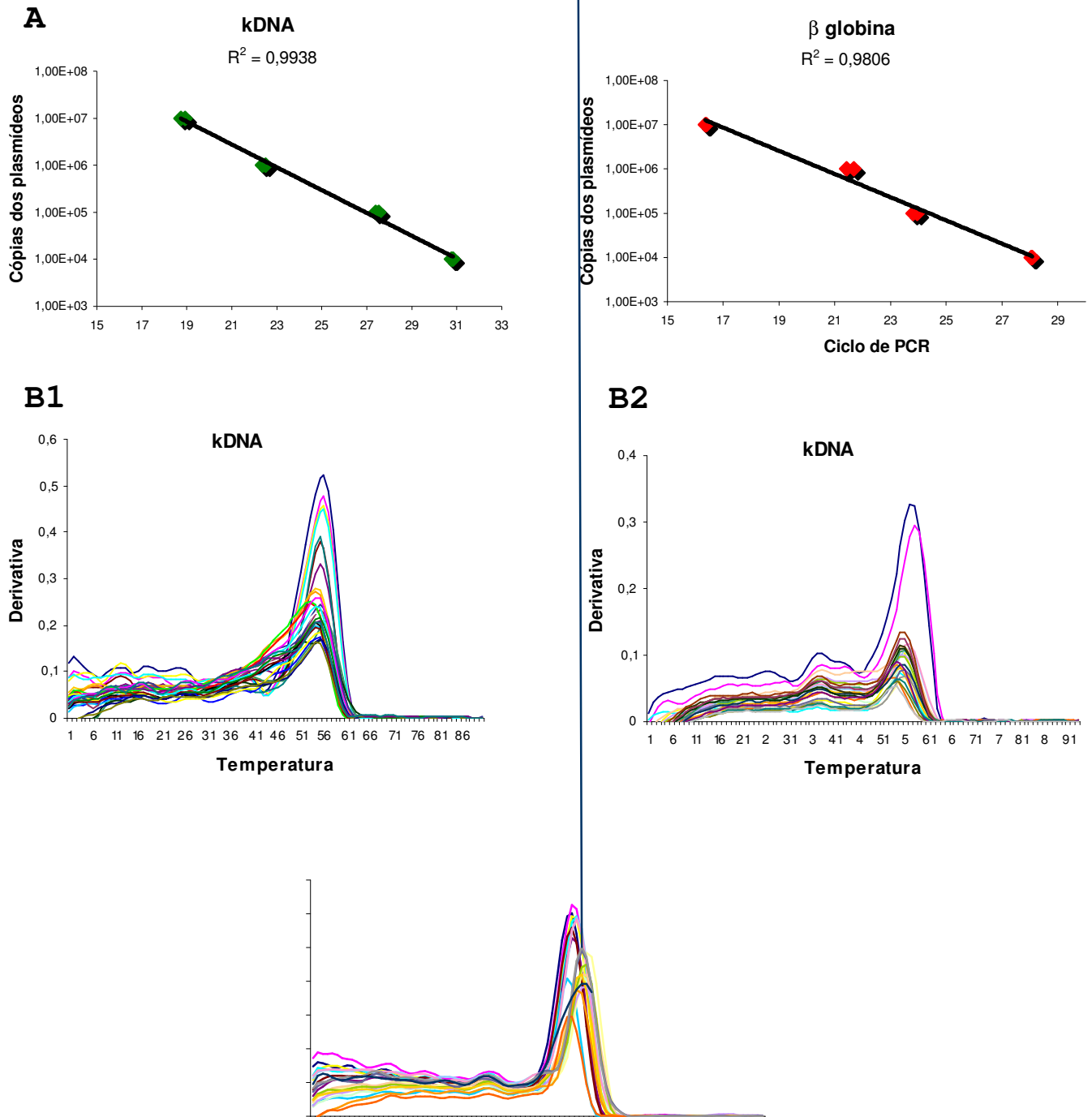


Figura 14 – Amplificação dos genes kDNA de *Leishmania* e β globina por qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de 120pb do kDNA e da β globina. Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. **B** – Gráficos da dissociação temperatura-dependente do SYBR Green mostrando a especificidade da amplificação dos genes kDNA de amostras de sangue (1), medula (2) e β globina (3).

5.2. Avaliação da carga de DNA de *Leishmania* em diferentes tecidos de cães com ECP e ECN, assintomáticos e sintomáticos

A figura 15A mostra a comparação do número de cópias do kDNA de *Leishmania* presente no sangue e na medula de 35 cães selecionados para a avaliação da carga parasitária. A análise dos resultados do qPCR mostrou que não houve diferença significativa na carga de DNA de *Leishmania* entre as amostras de sangue e medula de todos os cães avaliados ($p = 0,076$). Porém, a análise do número de cópias de kDNA nesses dois tecidos no grupo de cães que apresentaram exames convencionais positivos revelou que na medula destes animais havia mais parasitos que no sangue ($p = 0,014$ - figura 15B). Não foi encontrada diferença significativa na carga parasitária entre as amostras sangue e medula dos cães com exames convencionais negativos (ECN - $p = 0,892$).

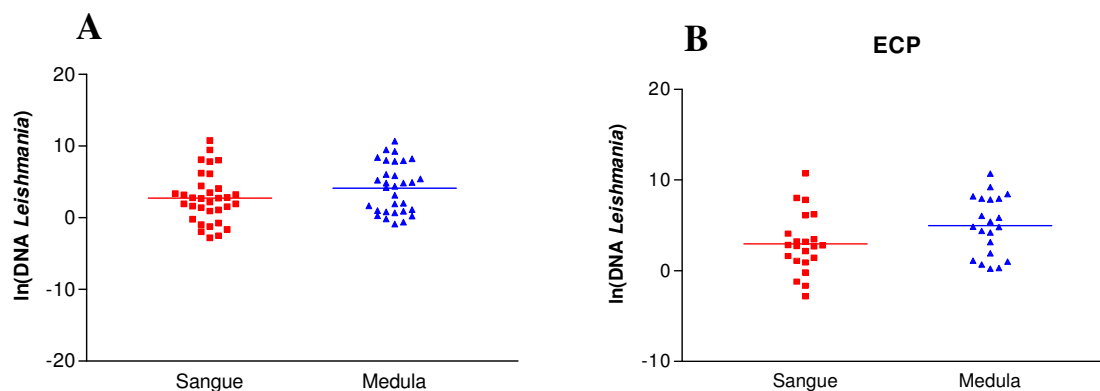


Figura 15 - Comparação da proporção de moléculas de kDNA de *Leishmania* determinado por qPCR no sangue e na medula dos cães avaliados; A - não houve diferença significativa na carga parasitária entre os dois tecidos de todos os 35 cães ($p = 0,076$). B - houve diferença na carga parasitária entre os dois tecidos dos cães com ECP ($p = 0,014$).

A comparação da carga de DNA de *Leishmania* entre os dois grupos de cães, ECP e ECN, mostrou que os cães com ECP apresentaram maior densidade de parasitos na medula ($p = 0,044$ - figura 16). No entanto, não foi observada esta diferença no número de parasitos presentes no sangue desses animais ($p = 0,570$).

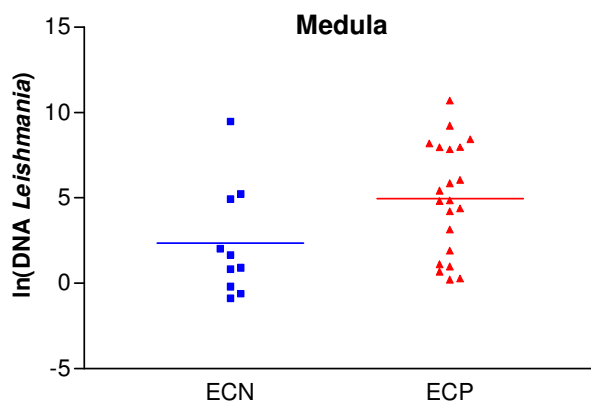


Figura 16 - Número de moléculas de DNA de *Leishmania* determinado por qPCR na medula de cães com ECN e ECP. Houve uma densidade parasitária significativamente mais alta na medula dos cães com ECP ($p = 0,044$).

Foi feita também a análise da carga parasitária separadamente para os cães agrupados de acordo com os testes sorológicos e parasitológicos convencionais com o objetivo de verificar se positividade desses métodos está relacionada com a densidade de parasitos. Os resultados da comparação entre os 3 grupos: PNSN, PNSP e PPSP, mostraram que no sangue desses cães não houve diferença significativa na carga de DNA de *Leishmania* ($p = 0,2517$). No entanto, os resultados do qPCR nas amostras de medula mostrou que houve diferença no número de cópias do kDNA entre o grupo PPSP e os demais (PNSN e PNSP), com uma valor de $p = 0,004$, (figura 17).

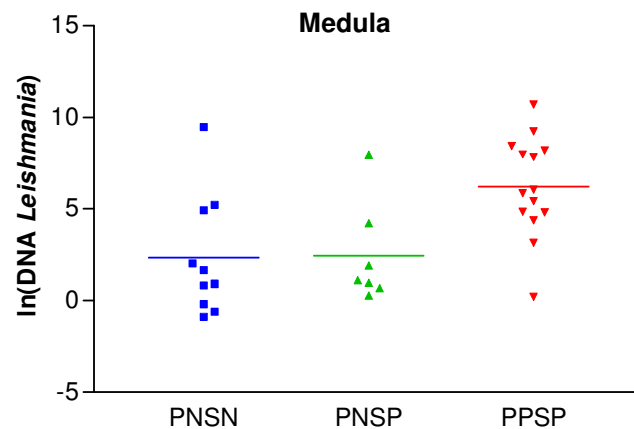


Figura 17 - Comparação do número de moléculas de kDNA de *Leishmania* determinado por qPCR na medula de cães dos grupos PNSN, PNSP e PPSP. Houve uma densidade parasitária significativamente mais alta na medula dos cães PPSP ($p = 0,004$).

Do total de 35 cães avaliados quanto à densidade parasitária no sangue e na medula, 21 eram assintomáticos e 14 sintomáticos. A comparação do número de cópias de DNA de *Leishmania* nas amostras de medula e sangue entre os grupos clínicos mostrou que não houve diferença significativa ($p = 0,933$ e $0,537$ para medula e sangue, respectivamente).



DISCUSSÃO

Muitos pesquisadores ainda questionam os efeitos da prevenção da LVC, baseada na eliminação de cães soropositivos, sobre a redução do número de casos humanos em áreas endêmicas (Reithinger et al. 2002; Capelli et al. 2004). Apesar disso, o cão é um importante reservatório da *L. i. chagasi* no ciclo doméstico, atuando na manutenção do parasito nesse ambiente. A participação dos cães domésticos no ciclo de transmissão da LV foi reconhecida desde a década de 50 no Nordeste brasileiro por Alencar, quando o sacrifício desses animais passou a ser usado como uma medida de controle da doença (Alencar 1961). A constatação de que os animais sintomáticos e mesmo os assintomáticos apresentam intenso parasitismo cutâneo, lhes confere um lugar de destaque na dinâmica da transmissão como fonte de infecção dos insetos vetores (Molina et al. 1994; Silva et al. 2001).

O papel do cão como principal reservatório de *L. i. chagasi* e fonte de infecção para os vetores tem aumentado o interesse pelo estudo de métodos que identifiquem a infecção nesses animais. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LVC. Métodos sorológicos e parasitológicos são amplamente empregados e muitos avanços já foram alcançados, mas nenhum deles apresenta 100% de especificidade e de sensibilidade. O problema dos testes sorológicos consiste principalmente na insegurança dos resultados, pois existe um alto índice de reações cruzadas e de falso-negativos. Com relação aos testes parasitológicos, são muito laboriosos para serem empregados na rotina de áreas endêmicas onde há uma demanda alta de exames, e principalmente têm a desvantagem de apresentarem sensibilidade muito baixa. Por causa dessas limitações os métodos convencionais de diagnóstico da LVC deixam lacunas na triagem dos cães infectados, contribuindo para a ineficácia da eutanásia de cães no controle da doença. Para tentar preencher estas lacunas, a

busca por métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos constitui o grande esforço de muitos parasitologistas.

Além disso, com a liberação e ampla comercialização da vacina contra LVC, composta por antígeno Fucose-manose-ligante, denominada Leishmune[®] (da Silva et al. 2000), tornou-se muito mais difícil discriminar entre cão vacinado e infectado. Através da sorologia convencional não é possível fazer essa distinção, uma vez administrada a vacina, o cão se apresentará sempre soropositivo. A padronização de um método diagnóstico que consiga detectar um animal seguramente infectado é de suma importância para a eficácia dessa medida preventiva e também para o sucesso dos programas de controle. O ponto chave dessa questão é a possibilidade de alguns cães mesmo vacinados se infectarem, e se isso acontecer, qual o seu potencial de transmissão para os vetores. E, nesse caso, como diagnosticar estes animais de forma segura. No âmbito do controle da doença, é preciso ter certeza de que uma vacina contra a doença canina previna realmente a infecção desse hospedeiro. Dessa maneira, faz-se necessário o estabelecimento de uma metodologia de detecção da infecção de cães por *Leishmania* que possua altas sensibilidade, especificidade e confiabilidade.

1. A PCR NO DIAGNÓSTICO DA LVC

Dentre os métodos moleculares para diagnóstico, a PCR é o que alia sensibilidade e especificidade à facilidade na sua realização. Não é necessária a utilização de sondas ou hibridização do DNA nem procedimentos laboriosos e lentos para a visualização dos resultados. Os produtos de PCR podem ser visualizados através de métodos padrão na biologia molecular, como Southern blotting e eletroforese em gel. Assim, nos últimos anos, diferentes ensaios de PCR foram desenvolvidos para a detecção de DNA de *Leishmania* em amostras clínicas, utilizando vários alvos. A escolha da seqüência alvo influencia na sensibilidade e especificidade. O máximo de sensibilidade é alcançado quando seqüências presentes em cópias múltiplas são utilizadas. Exemplos de tais seqüências alvo são genes do RNA ribossomal, DNA do cinetoplasto (kDNA), genes de RNA derivados do mini-exon e repetições genômicas (Alvar et al., 2004). A especificidade da PCR pode ser adaptada às necessidades particulares pela utilização de alvos em regiões conservadas ou variáveis. Dessa maneira é possível caracterizar o parasito presente na amostra ao nível de gênero, complexo, espécie ou até mesmo isolado.

Os ensaios de PCR utilizados nesse estudo apresentaram relativa facilidade na execução, assim como bons índices de positividade. Além disso, um grande número de cães (217) e de amostras clínicas foi empregado para avaliar o desempenho da PCR.

Nossos resultados mostraram que foi possível verificar a presença do fragmento de 120pb do kDNA de *Leishmania* até a concentração 0,1 fg/ μ l. Uma característica que contribuiu para a alta sensibilidade da PCR conseguida nestes ensaios foi a seqüência utilizada como alvo. O cinetoplasto contém aproximadamente 10.000 minicírculos de DNA e a região conservada

desses minicírculos é um alvo ideal para as reações de PCR (Gomes et al. 2006). Manna et al. (2004) descreveram uma sensibilidade da PCR 10.000 vezes menor (1pg de DNA), no entanto os autores utilizaram um outro par de iniciadores, que amplifica uma seqüência de 116pb também do kDNA. Além disso, em nossos experimentos utilizamos gel de poliacrilamida corado pela prata para revelar os produtos de PCR em vez de gel de agarose corado com brometo de etídeo como os autores citados acima. A separação dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida corado pela prata é uma técnica bem mais sensível, aumentando a capacidade de visualizar bandas fracas, que provavelmente não apareceriam no gel de agarose.

A PCR tem se mostrado sensível e específica para o diagnóstico da LV também a partir de amostras clínicas provenientes de casos humanos (Silva et al. 2001; Martin-Sanchez et al. 2004) e caninos (Solano-Gallego et al. 2001; Leontides et al. 2002; Ikonomopoulos et al. 2003; Manna et al. 2004). Porém, alguns cuidados devem ser tomados para otimizar os resultados obtidos, como a utilização de salas separadas para a preparação das reações e visualização de produtos amplificados e a inclusão de controles positivos e negativos em todas as reações. Em nossos experimentos, além dos controles das reações de amplificação, utilizamos um controle do processo de extração de DNA, a PCR de um gene constitutivo presente em todas as células de mamíferos. Assim, as amostras negativas na PCR convencional foram submetidas à amplificação do gene β globina. Concluimos que nas amostras negativas para essa PCR, a etapa de extração do DNA não foi bem sucedida. Nossas hipóteses são que foi isolado pouco DNA da amostra ou havia a presença de algum contaminante que inibiu a reação de PCR.

Existem poucos trabalhos comparando o diagnóstico da LVC baseado na PCR utilizando diferentes tecidos. O presente estudo avaliou amostras de pele, sangue e medula óssea. A comparação entre as diferentes amostras clínicas nas reações de PCR mostrou que medula e pele foram as mais adequadas para a detecção de DNA de *Leishmania*. Resultados semelhantes já foram descritos por outros autores: Solano-Gallego et al. (2001) encontraram 51% de positividade em amostras de pele, 32% em conjuntiva e 18% em medula óssea; Manna et al. (2004) observaram que a pele, independente da presença de lesões cutâneas, foi melhor que sangue e linfonodo para detectar DNA de *Leishmania* por PCR.

Quando foi analisada a eficácia da PCR utilizando os diferentes tecidos na amostra total de cães, observamos que a medula apresentou índice de positividade superior ao do sangue. Já os resultados obtidos com as amostras de pele não apresentaram diferença significativa em relação às amostras de medula e sangue. A principal desvantagem da utilização de medula óssea como fonte de DNA para as reações de PCR são as dificuldades envolvidas na técnica de coleta do material quando levantamentos epidemiológicos em larga-escala são necessários. A biópsia de um pequeno fragmento de pele é bem mais simples e menos invasiva, e provou ser também uma boa fonte de DNA para detecção de *Leishmania* em cães. Apesar de ter tido um menor número de positivos, a PCR em amostras de sangue apresentou uma porcentagem de detecção do parasito significativa, o que não desqualifica esse tecido como fonte de DNA para a realização do diagnóstico através da PCR.

As análises considerando os cães agrupados segundo a forma clínica não mostraram diferenças em relação ao tipo de amostra tanto no grupo dos assintomáticos quanto dos sintomáticos. Portanto, com base nestes resultados, podemos inferir que o tipo de amostra (medula, sangue ou pele) não teve influência determinante nos índices de positividade observados.

2. A PCR E AS FORMAS CLÍNICAS

O desempenho da PCR como teste diagnóstico entre os cães com diferentes formas clínicas também não foi estatisticamente diferente. Ao contrário da PCR, a comparação da proporção de animais positivos entre os grupos clínicos foi diferente quando utilizados testes sorológicos e parasitológicos convencionais. Entre os cães sintomáticos houve maior número de resultados positivos que nos assintomáticos (figuras 7 e 8), indicando que as infecções mais antigas são mais facilmente detectadas por estes métodos. Provavelmente devido a uma maior produção de imunoglobulinas como também uma multiplicação mais intensa do parasito nos sintomáticos. Relatos prévios têm documentado uma baixa sensibilidade da RIFI para o diagnóstico da infecção canina por *L. i. chagasi* em animais assintomáticos (Dye et al. 1993), e têm mostrado que a LVC assintomática é caracterizada principalmente por imunidade mediada por células, e em menor grau por aumento da resposta humoral IgG2 (Bordoisseau et al. 1997; Cabral et al. 1998). Nossos resultados mostram que a PCR é um bom método para detectar DNA de *Leishmania* independentemente da forma clínica apresentada pelo cão. Este aspecto é um importante ganho no diagnóstico da LVC se considerarmos as limitações dos métodos sorológicos e parasitológicos convencionais na detecção da infecção inaparente.

Outro achado que reforça a aplicabilidade da PCR para o diagnóstico da LVC foi o bom desempenho do método em cães tanto com exames convencionais positivos quanto negativos. Os resultados mostram que até mesmo naqueles animais em que os métodos tradicionais falharam em diagnosticar a infecção, a PCR obteve sucesso. Como esperado, no grupo PPSP houve uma porcentagem mais alta de cães PCR positivos em relação aos grupos PNSP e PNSN, o que confirma a sensibilidade e especificidade da técnica. A PCR foi positiva em 97,2% dos cães avaliados

(considerando os animais com pelo menos uma amostra clínica positiva), a sorologia 67,7% e o parasitológico 47% (figura 9). A ausência de bandas nos controles negativos da PCR assegurou que os produtos de PCR observados não estavam relacionados à contaminação e sim, à presença de DNA de *Leishmania* no material biológico. Esses resultados reforçam a idéia de que os métodos diagnósticos utilizados na rotina em áreas endêmicas subestimam o número de animais infectados. Os resultados encontrados indicam que o emprego da PCR em associação com um ou mais métodos sorológicos e/ou parasitológicos poderia auxiliar na determinação do número de infecções inaparentes, visto que já foi demonstrado que a PCR é adequada para detectar infecção canina sub-clínica por *Leishmania* (Solano-Gallego et al., 2001).

Grande parte dos estudos publicados sobre leishmaniose canina foi baseada na sorologia, principalmente utilizando os métodos RIFI, ELISA e DAT (Gradoni et al. 1999; Ferreira, E.C. 2005). A sorologia detecta a maioria dos cães sintomáticos (Koutinas et al. 1999), e uma proporção dos assintomáticos, que compõem uma grande parte da população canina de áreas endêmicas. No entanto, Almeida et al. (2005) afirmam que para se conseguir resultados satisfatórios é essencial o uso de dois testes diferentes associados para a sorologia da LVC. Evidentemente, o grande problema no controle da doença canina são os cães assintomáticos que passam por negativos nos inquéritos sorológicos.

Em nosso estudo, houve um grande número de animais assintomáticos positivos na PCR (69/73). Destes, muitos eram negativos nos exames sorológicos (93%), indicando um número alto de falso-negativos, se considerarmos os cães PCR positivos como verdadeiramente infectados. Silva, E.S. (2001) também observou um número alto de cães infectados assintomáticos em um estudo na região metropolitana de Belo Horizonte. De fato, muitos dos

infectados apresentam forma inaparente ou oligossintomática da doença, e o número de casos com sinais manifestos é relativamente pequeno em relação ao de infectados (Alvar et al. 1997). É possível que alguns dos cães com sorologia negativa entraram em contato com o parasito, se infectaram, mas não tinham produzido ainda títulos detectáveis de anticorpos. Como os métodos sorológicos falham em detectar cães infectados no período pré-patente da infecção e antes da soroconversão, aqueles que nunca vão soroconverter e os cães soropositivos que convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados (Dye et al. 1992; Dye et al. 1993; Pinelli et al. 1994; Quinell et al. 1997), o número alto de cães infectados encontrados através da PCR pode ser justificado pelas limitações da sorologia convencional.

Recentes estudos usando técnicas moleculares, tais como a PCR, para determinar a prevalência da infecção em cães de áreas endêmicas têm mostrado que a porcentagem de infectados é mais alta que dos animais que desenvolvem a doença (Berrahal et al. 1996; Sideris et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2001). Portanto, a infecção do cão por *L. i. chagasi* não quer dizer que ele ficará doente, sabendo-se que a história natural da doença pode evoluir de diferentes maneiras. Alguns animais podem controlar a multiplicação dos parasitos e curar a infecção, em outros a infecção pode permanecer subclínica por tempo indefinido e naqueles que não tiverem a capacidade de controlar o parasito, a doença progride. Nestes, após dois a quatro meses de incubação os sintomas da LVC aparecem (Fisa et al. 1999; Quinnell et al. 2001; Moreno & Alvar 2002).

A avaliação da concordância entre a PCR e os métodos sorológico e parasitológico utilizando o índice *Kappa* (tabela 3), mostrou que houve concordância ruim entre a PCR e a sorologia e que foi fraca a concordância entre a PCR e o parasitológico. Considerando que os animais positivos na PCR são os verdadeiros

infectados, a concordância entre a PCR e os métodos convencionais foi ruim devido ao grande número de falso-negativos.

Considerando-se que a prevalência da LVC é comumente determinada por levantamentos soroepidemiológicos e que cães soropositivos têm indicação de eutanásia como uma das medidas para o controle da transmissão (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006) podemos identificar alguns problemas:

- i. a sensibilidade limitada das técnicas sorológicas, discutida anteriormente, leva a uma intervenção incompleta deixando no foco animais soronegativos, porém infectados, os falso-negativos;
- ii. por outro lado, em determinadas situações, também é possível superestimar a prevalência devido a baixa especificidade dos antígenos utilizados podendo ocorrer falso-positivos devido às reações cruzadas ou à infecção transitória que será eliminada pelo cão posteriormente (Alvar et al. 2004).

Em nosso estudo, todos os cães parasitologicamente positivos (n = 102) foram também positivos na PCR. No entanto, cinco cães positivos na sorologia foram negativos na PCR, sugerindo que estes eram na verdade, falso positivos, provavelmente devido à reações cruzadas. Em estudo realizado testando 20 soros de cães infectados com diferentes patógenos foi observada reação cruzada na RIFI e ELISA em um número significativo de soros de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis* (Ferreira et al. 2007). Estas observações já haviam sido relatadas anteriormente por Costa et al. (1991) e Mancianti et al. (1996).

Considerando as diferentes formas clínicas que os cães infectados por *Leishmania* podem apresentar e nossos resultados satisfatórios em relação ao desempenho da PCR no diagnóstico da LVC, acreditamos que a PCR poderá auxiliar na elucidação de situações duvidosas que podem envolver a caracterização do padrão epidemiológico da doença e também casos clínicos em particular.

Dentre estas situações, estão os cães assintomáticos e negativos para os exames convencionais residentes em áreas endêmicas, cães com resultados dúbios devido à contradição de vários resultados e também a real situação de cães vacinados. Portanto, para fins de melhoria no diagnóstico de cães assintomáticos de área endêmica, confirmações de casos individuais e monitoramento de cães vacinados, sugerimos a utilização da PCR como ferramenta auxiliar. Enfatizamos esta sugestão, acrescentando que, ao contrário do que se pensa até então, a PCR não é mais tão laboriosa e nem possui o custo tão elevado. Já existem reagentes de diversas marcas no mercado, vários procedimentos para extração de DNA foram padronizados e também uma gama de protocolos de amplificação. Estes fatores vêm contribuindo para simplificar, diminuir os custos e agilizar a obtenção dos resultados baseados na PCR. Portanto, com base em nossos resultados podemos reforçar que a utilização da PCR em associação com os testes tradicionais seria muito útil para o diagnóstico da LVC, contribuindo para a melhoria das ações efetuadas pelos programas de controle.

3. IDENTIFICAÇÃO DA(S) ESPÉCIE(S) DE *LEISHMANIA* ATRAVÉS DA PCR-RFLP

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam num determinado foco de transmissão é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e para o planejamento de estratégias de controle. Tratando-se de leishmaniose visceral nas Américas, a única espécie considerada responsável pela doença é a *L. (L.) i. chagasi*. O conhecimento das espécies de *Leishmania* é particularmente importante em regiões onde a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar (LT) ocorrem simultaneamente (Schallig & Oskam 2002). No Brasil, existem muitas regiões endêmicas para ambas, como é o caso da região metropolitana de Belo Horizonte.

Os cães são conhecidos por serem os principais reservatórios domésticos da *L. (L.) infantum chagasi*, mas ainda é questionável o seu papel como reservatório do agente etiológico da LT, ainda assim, é fato que esses hospedeiros contribuem para a ocorrência de *L. braziliensis* no ambiente doméstico e peridoméstico (Falqueto 1986; Gontijo et al. 2002). Existem muitas regiões onde se encontram os agentes etiológicos da LV e da LTA de forma simpátrica, porém a presença de cães infectados ao mesmo tempo por *L. chagasi* e *L. braziliensis* não é tão comum. Madeira et al. (2005) relataram o primeiro caso de infecção mista com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) i. chagasi* em um cão naturalmente infectado no Rio de Janeiro. Os parasitos isolados de lesões cutâneas foram caracterizados como *L. braziliensis* e os isolados de sangue e linfonodos como *L. (L.) i. chagasi*.

As técnicas usualmente empregadas para a identificação de *Leishmania* compreendem a caracterização isoenzimática (Cupolillo et al. 1994), anticorpos monoclonais, PCR associada à hibridização molecular com marcadores radioativos (Fernandes et al. 1999; Silva et al. 2004) ou quimioluminescentes (Bastrenta et al. 2002) e PCRs específicas para as regiões variáveis de cada

espécie ou complexo de espécies (de Bruijn & Barker 1992; Eresh et al. 1994; Cortes et al. 2004; Gomes et al. 2006). A análise de isoenzimas requer o isolamento e cultivo do parasito, a utilização de anticorpos monoclonais é limitada pela possibilidade de reações cruzadas, a PCR específica e a PCR associada à hibridização são técnicas muito dispendiosas. As sondas aumentam a sensibilidade na detecção dos parasitos, mas não contribuem tanto para a identificação de espécies (Volpini et al. 2004). Entretanto, a metodologia considerada como padrão-ouro na identificação específica de amostras de *Leishmania* ainda é a eletroforese de isoenzimas (WHO, 1990). Porém, quando não é possível o isolamento do parasito e são utilizadas amostras clínicas, os métodos baseados na PCR são amplamente empregados.

Neste trabalho empregamos uma metodologia que confere mais rapidez e segurança na identificação de espécies de *Leishmania*: a PCR-RFLP (Volpini et al. 2004). Todas as amostras de cães positivos na PCR convencional para o gênero *Leishmania* foram caracterizadas em relação à espécie do parasito. Assim, o produto amplificado a partir do DNA extraído de uma das amostras (pele, medula e sangue) foi submetido à PCR-RFLP com a enzima Hae III. Os perfis de restrição da região conservada dos minicírculos do kDNA mostraram ser muito adequados para a identificação de *Leishmania*. Em algumas amostras que apresentaram perfis de restrição duvidosos ou bandas muito fracas, a PCR foi repetida utilizando DNA 'template' um pouco mais concentrado. Assim, conseguimos identificar a espécie presente em todas as amostras.

Os 212 cães portadores de *Leishmania* diagnosticados neste estudo eram provenientes de uma área endêmica para as leishmanioses em Belo Horizonte. Neste local, estava ocorrendo um surto de LV com intensa transmissão e um grande número de casos humanos e caninos no período em que as amostras foram coletadas. Apesar de ser uma área com elevado número de casos de LV, também foram registrados casos de LT. A espécie de *Leishmania* presente

em 194 dos 212 cães PCR positivos foi identificada através da PCR-RFLP. Encontramos *L. braziliensis* na amostra de sangue de um cão e na medula de outro, sendo que estes foram os únicos tecidos positivos destes animais na PCR convencional. Contudo, a grande maioria das amostras, 192 animais, estava infectada por *L. i. chagasi*, corroborando com o grande número de casos humanos de LV na área. Em 18 cães não foi possível caracterizar a espécie de *Leishmania*, porque não havia DNA extraído suficiente, ou então o perfil de restrição obtido foi duvidoso.

Apesar de medidas de controle da LV serem exaustivamente empregadas, a incidência da doença continua aumentando (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde 2006; WHO 2006). A falha dos programas de controle em conter o avanço da LVC pode ser

positivos d243tro, na tes -35n-10(orológtec35n-10éa)lais 76e, ou 35n-10p

4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA DE DNA DE *LEISHMANIA* ATRAVÉS DO qPCR

A avaliação da carga parasitária em hospedeiros infectados por *Leishmania* é feita atualmente, por métodos um tanto quanto laboriosos e subjetivos (ensaios de microdiluição limitante e LDU). Os ensaios moleculares podem melhorar a sensibilidade e a confiabilidade da quantificação de níveis parasitários em amostras clínicas. A técnica de PCR em tempo real foi empregada com este objetivo em vários trabalhos (Vitale et al. 2004; Francino et al. 2006; Manna et al. 2006) e realmente atingiu bons resultados. No presente estudo, nos propusemos a padronizar um ensaio de PCR em tempo real seguro e específico para quantificar os níveis de DNA de *Leishmania* em diferentes tecidos. Todos os relatos de qPCR em cães foram realizados através do sistema *Taq-Mam*, que apresenta boas sensibilidade e especificidade, porém tem a desvantagem de ter alto custo e necessidade de uma seqüência alvo igual ou maior que 300pb. Então, optamos por empregar um ensaio de qPCR que alia baixo custo à praticidade, sem perder a sensibilidade e especificidade que uma boa técnica de quantificação precisa ter. A técnica PCR quantitativo em tempo real utilizando o sistema SYBR Green foi então padronizada para a quantificação do número de cópias do fragmento de 120pb do kDNA de *Leishmania* e mostrou ser apta para o estudo de carga parasitária, como evidenciam nossos resultados.

Dessa maneira, o ensaio SYBR Green PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi padronizado com o intuito de ser uma alternativa para o monitoramento dos índices de parasitismo em hospedeiros vertebrados. Durante a infecção por *Leishmania*, o parasitismo em diferentes órgãos pode diferir, por isso é relevante para propósitos de diagnóstico a identificação dos compartimentos que apresentam maiores níveis de parasitos, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do diagnóstico da LVC (Reis et al. 2006). A análise das correlações entre a carga de DNA de

Leishmania, positividade dos testes convencionais de diagnóstico e forma clínica da doença, pode prover informações importantes para uma melhor compreensão da evolução da infecção nos cães.

A quantificação dos parasitos no sangue e na medula óssea não mostrou diferença em um total de 35 cães avaliados; entretanto, no grupo ECP houve uma maior quantidade de parasitos na medula do que no sangue (figura 12) e no grupo dos animais ECN não foi observada esta diferença. Os resultados sugerem que quando a carga parasitária é mais alta na medula, os métodos convencionais são mais sensíveis para diagnosticar a infecção. Talvez porque nesse estágio, os parasitos já estão bem estabelecidos nesse órgão e a doença já esteja mais avançada com um tempo longo de estimulação do sistema imune e/ou maior multiplicação do parasito. Porém, não podemos inferir o mesmo para a amostra sangue, que mostrou não ter nenhuma correlação entre a sua carga parasitária e o aumento da sensibilidade dos testes diagnósticos. De acordo com Cardoso e Cabral (1998), o aspirado de medula óssea é mais sensível e, portanto mais indicada para o diagnóstico. No entanto, Abranches et al. (1991) atestam que o exame de medula leva a resultados positivos somente durante estágios avançados da LVC.

A análise da carga de parasitos na medula entre os grupos PPSP, PNSP e PNSN, mostrou que os animais com exames parasitológicos positivos apresentaram maior número de cópias de DNA de *Leishmania*. Os métodos parasitológicos convencionais utilizados neste estudo foram mielocultura e leitura de lâminas contendo esfregaço de medula. Isto pode justificar a relação direta encontrada entre testes parasitológicos positivos e altos níveis de carga parasitária neste tecido. Como não foi realizado nenhum teste parasitológico utilizando sangue, esta relação não foi encontrada para esta amostra.

Foi relatado por outros autores (Cardoso & Cabral 1998) que após a infecção, a partir do sítio de inoculação na pele, os

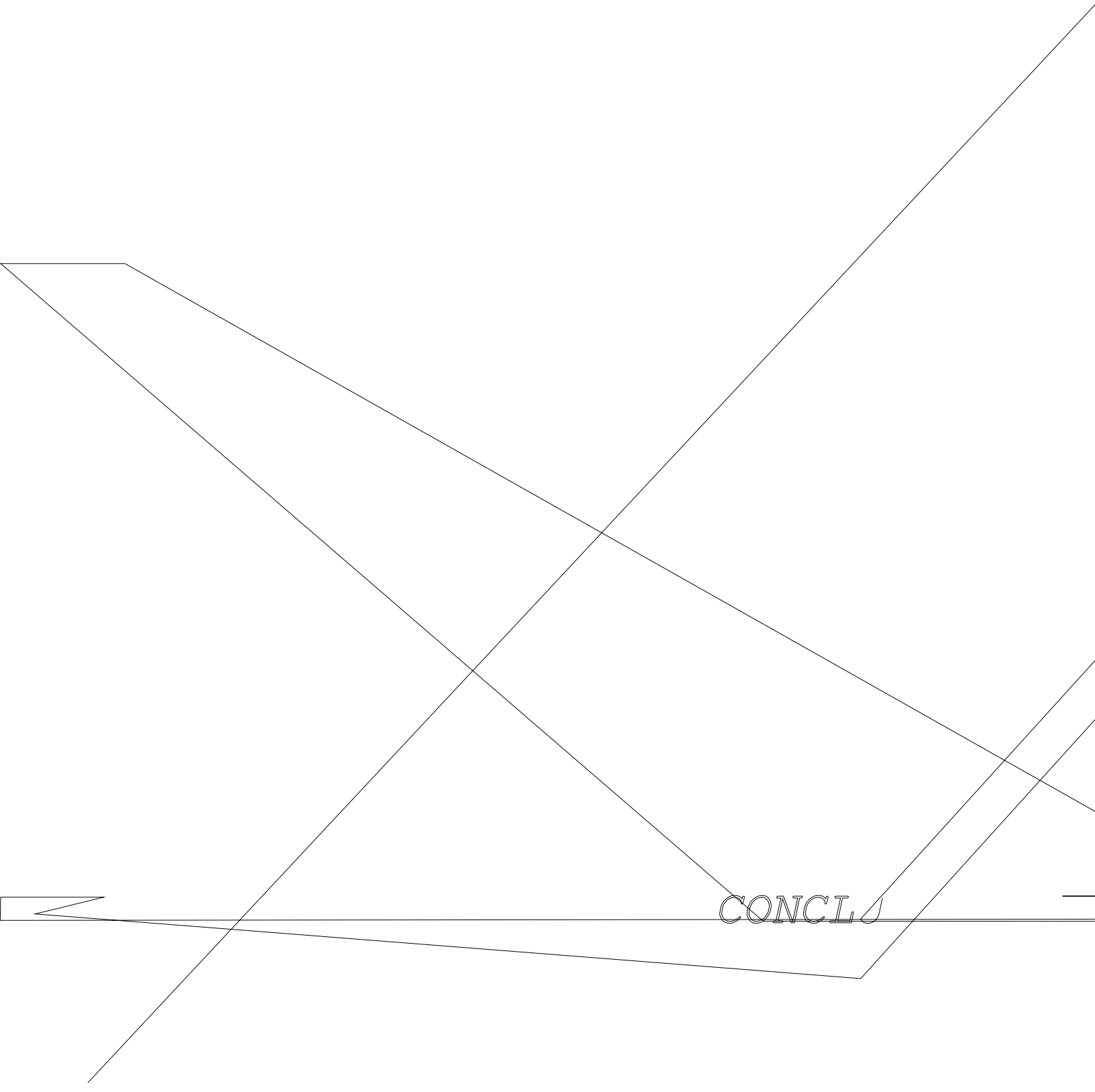
parasitos se disseminam para os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, rins, pulmões e trato gastrintestinal, mas raramente são detectados nas vias sanguíneas. De fato, o sangue parece ter somente o papel de disseminador de parasitos e não de órgão reservatório. Manna et al. 2006, observaram que a quantificação da carga parasitária no sangue, especialmente dos cães assintomáticos, parece não ser crítica para predizer clinicamente o curso da infecção.

A quantidade de cópias de kDNA de *Leishmania* variou enormemente, mas valores muito altos foram raramente obtidos. De fato Ferrer (2002) considerou que em condições naturais, os flebotomíneos transmitem baixo número de promastigotas (100-1000), os quais são suficientes para induzir doença em cães susceptíveis. No entanto, a competência imunológica e outras condições intrínsecas do hospedeiro influenciam de maneira muito mais determinante nos níveis parasitários subseqüentes à infecção do que a carga inoculada pelo vetor. Apesar disso, os níveis de DNA “template” de *Leishmania* para cada tecido foram seguramente obtidos, visto que todas as amostras foram amplificadas em duplicata. Além disso, foi utilizado em todas as reações de qPCR iniciadores que amplificam para o gene da β -globina, que foi o normalizador quantitativo.

Ao contrário de outros relatos (Reis et al. 2006; Manna et al. 2006), em nosso estudo não encontramos nenhuma diferença na carga de DNA de *Leishmania* entre os cães sintomáticos e assintomáticos. Isso pode ter acontecido em decorrência do tamanho da amostra (35 cães) e porque apenas dois tecidos foram avaliados, o que não permitiu uma comparação mais completa das possíveis diferenças existentes entre os vários órgãos do hospedeiro infectado. A existência de uma correlação direta entre a presença de sintomas e a carga parasitária alta não é um consenso. Alvar (2004), afirma que a evolução da doença canina parece partir de uma condição anérgica, com disseminação

generalizada, grande número de parasitos e poucos ou nenhum sinal clínico para uma forma hiperreativa, na qual nenhum parasito é detectado, mas os cães apresentam lesões orgânicas significantes e sintomatologia grave. Portanto, investigações adicionais utilizando uma maior variedade de amostras clínicas em um número maior de cães de cada forma clínica devem ser realizadas para que esses questionamentos sejam elucidados.

Dessa forma, nossos resultados constituem um primeiro passo para a validação da técnica SYBR Green - qPCR como um método de custo relativamente baixo, se comparado a outras formas de quantificação molecular. Podemos afirmar que esta é uma metodologia segura e promissora para auxiliar nos estudos de monitoramento dos níveis de parasitismo em amostras clínicas com inúmeras aplicações práticas como, por exemplo, em animais submetidos ao tratamento



CONCLU

A PCR se mostrou uma ferramenta sensível, específica e útil para a detecção de *Leishmania* em amostras clínicas de cães naturalmente infectados, independentemente da forma clínica apresentada.

A PCR detectou um maior número de cães infectados por *Leishmania* do que os métodos sorológicos e parasitológicos utilizados no diagnóstico de rotina da LVC.

As amostras medula de óssea e pele foram as mais adequadas para o diagnóstico através da PCR. No entanto, sugerimos a pele como amostra de escolha para o diagnóstico da LVC devido à maior facilidade de coleta do material.

A PCR-RFLP como ferramenta para identificação da espécie de *Leishmania* apresentou facilidade, custo moderado e confiabilidade para ser utilizada em estudos epidemiológicos.

O PCR quantitativo em tempo real mostrou ser uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de *Leishmania*, visto que as técnicas até então utilizadas são laboriosas e pouco sensíveis, principalmente, para detecção de cargas parasitárias baixas.

As metodologias baseadas na PCR podem ser especialmente úteis em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral que possuem um grande número de cães que apresentem a forma assintomática da doença.

Nossos resultados sugerem que a prevalência da infecção por *Leishmania* pode ser subestimada quando são utilizados apenas testes sorológicos nos inquéritos da LVC em áreas endêmicas.

Nossas observações apontam para a necessidade da utilização de um método diagnóstico mais sensível e específico em áreas endêmicas, onde existe um grande número de cães assintomáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, A.; Inoue, K.; Tanaka, T.; Kato, J.; Kajiyama, N.; Kawaguchi, R.; Tanaka, S.; Yoshida, M.; Kohara, M. 1999. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2899-2903.
- Abranches, P.; Silva-Pereira, M.C.; Conceição-Silva, F.M.; Santos-Gomes, G.M.; Janz, J.G. 1991. Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77: 557-561.
- Alencar, J.E. 1961. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* 3: 175-180.
- Almeida, M.A.O.; Jesus, E.E.V.; Sousa-Atta, M.L.B.; Alves, L.C.; Berne, M.E.A. & Atta, A.M. 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasit.* 127: 227-232.
- Alvar J.; Canavate, C.; Molina, R.; Morene, J.; Nieto, J. 2004. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology.* 57: 1-88.
- Alvar, J.; Canavate, C.; Gutierrez-Solar, B.; Jimenez, M.; Laguna, F.; Lopez-Velez, R.; Molina, R.; Moreno, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(2):298-319
- Andrade, H.M; Reis, A.B.; dos Santos, S.L.; Volpini, A.C.; Marques, J.M. & Romanha, A.J. 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasit* (in press).
- Arias, J.R; Monteiro, P. & Zicker, F. 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brasil. *Emerging Infectious Diseases*, 2(2): 145-146.
- Ashford, D. A.; Bozza, M.; Freire, M.; Miranda, J. C.; Sherlock, I.; Eulálio, C.; Lopes, U.; Fernandes, O.; Degraeve, W.; Barker Jr, R. H.; Badaró, R.; David, J. R. 1995. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Hyg.* 53 (3): 251-255.
- Avila, H.; Gonçalves, A.M.; Nehme, N.S.; Morel, C.M.; Simpson, L. 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol. Sep.* 42(2):175-87.

- Badaró, R.; Lourenço, R.; Carvalho, E.M.; Teixeira, R.; Cerf, B. & Jones, T.C., 1983. Estudo longitudinal soro epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em área endêmica de Jacobina-BA. In: *Reunião Anual sobre Doenças de Chagas*, 10., Caxambu.
- Badaró, R.; Jones T.C.; Lorencó R.; Cerf B.J.; Sampaio, D.; Carvalho E.M.; Rocha H.; Teixeira R.; Johnson, W.D. Jr. 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.* 154: 639-649.
- Barbieri, C. L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Paras. Immunol.* 28: 329-337.
- Barker, D.C.; Butcher, J. 1983. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(3):285-97.
- Bassler, H.A.; Flood, S.J.; Livak, K.J.; Marmaro, J.; Knorr, R.; Batt, C.A. 1995. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3724-3728.
- Bastrenta, B.; Buitrago, R.; Vargas, F.; Le Pont, F.; Torrez, M.; Flores, M.; Mita, N.; Brenière, S.F. 2002. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia)* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96: 55-63.
- Berrahal, F.; Mary, C.; Roze, M.; Berenger, A., Escoffer, K.; Lamouroux, D. & Dunan, S. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. Jour. Of Trop. Med. And Hyg.* 55: 273-277.
- Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C.; Hoareau, E.; Boheringer, C.; Stolle, T. & Chabanne, L. 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145: 171-176.
- Bretagne, S.; Durand, R.; Olivi, M.; Garin, J.F.; Sulahian, A.; Rivollet, D.; Vidaud, M.; Deniau, M. 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 828-831.

- Bruña-Romero, O.; Hafalla, J.C.R.; Gonzalez-Aseguinolaza, G.; Sano, G.; Tsuji, M.; Zavala, F. 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single *Anopheles* mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int. J. Parasitol.* 31: 1499-1502.
- Cabral, M.; O'Grady, J. E.Gomes, S.; Souza, J.C; Thompson, H.; Alexander, J. 1998. The imunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76: 173-180.
- Camargo-Neves, V.L.F. 2004. A leishmaniose visceral Americana no estado de São Paulo (article in Portuguese). *Bol. Epidemiol. Paul.* 6. Available at: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- Capelli, G.; Baldelli, R.; Ferroglio, E.; Genchi, C.; Gradoni, L. Gramiccia, M.; Maroli, M.; Mortarino, M.; Pietrobelli, M.; Rossi, L.; Ruggiero, M. 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia.* 46(1-2):193-7. Review. Italian.
- Cardoso, L. & Cabral, M. 1998. Leishmania and canine Leishmaniasis. *Rev. Port. C. Vet.* XCIII (527): 122-141.
- Collantes-Fernandez, E.; Zaballos, A.; Alvarez-Garcia, G.; Ortega-Mora, L.M. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1194-1198.
- Cortes, S.; Rolão, N.; Ramada, J. & Campino, L. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 98: 12-17.
- Costa, C.A.; Genaro, O.; Lana, M.; Magalhaes, P.A.; Dias, M.; Michalick, M.S.M.; Melo, M.N.; Costa, R.T.; Magalhaes-Rocha, N.M.; Mayrink, W. 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliacao da metodologia sorologica utilizada em inqueritos epidemiologicos. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 24:21-25.
- Costa, C.H.N. 2001. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. Informe Técnico. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.* 34: 223-228.
- Cunha, A.M. & Chagas, E. 1937. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* sp previous note. *Hospital (Rio de Janeiro)* 11:3-9.

- Cupolillo E; Grimaldi Jr. G.; Momen, H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
- Cupolillo E; Grimaldi Jr. G.; Momen, H.; Beverley S.M. 1995a. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 73: 145 -155.
- Cupolillo E; Grimaldi Jr. G.; Momen, H. 1995b. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol* 89: 17-23.
- Da Silva, V.O.; Borja-Cabrera, G.P.; Pontesa, N.N.C.; de Souza, E.P.; Luz, K.G.; Palatnik, M. & Palatnik de Sousa, C.B. 2000. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*. 19(9-10): 1082-1092.
- Dantas-Torres, F. 2006. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 117-118.
- De Bruijn, M.H.L. & Barker, D.C. (1992) Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Ac. Trop.* 52: 45-58.
- Deane, M.P & Deane, L.M. 1954. Infecção experimental do *Phlebotomus longioalpis* em raposas (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectadas pela *Leishmania donovani*. *O Hospital*. 46: 651-653
- Deane, L.M. & Deane, M.P., 1955a. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. *O Hospital*. Rio de Janeiro, 48 (1):61-76.
- Deane, L.M. & Deane, M.P. 1955b. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 47: 75-87.
- Deane, L.M. 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 44-67.

- Degrave, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U. 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 89: 463-469.
- Donovan, J.W.; Ladetto, M.; Zou, G.; Neuberg, D.; Poor, C.; Bowers, D.; Gribben, J.G. 2000. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 95: 2651-2658.
- Dye, C., Killick-Kendrick, R., Vitutia, M. M., Walton, R., Killick-Kendrick, M., Harith, A. E., Guy, M. W., Canavate, M. C., e Hasibeder, G. 1992. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105, 35-41.
- Dye, C., Vidor, E., e Dereure, J. (1993). Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.* 103, 647-656.
- Ellis, J.T & Crampton, J.M. 1991. Differences between *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *L. (L.) infantum* and *L. (L.) donovani* as shown by DNA fingerprinting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86(4):479-81.
- Eresh, S.; McCallum, S.M.; Barker, D.C. 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 109: 423-433.
- Falqueto, A.; Coura, J.R.; Barros, G.C.; Grimaldi Jr., G.; Sessa, P.A.; Carias, V.R.D.; Jesus, A.C.; Alencar, J.T.A. 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 81: 155-163.
- Fernandes, O.; Catanho, M.P.; Segura, I.; Labrada, L.A.; Derre, R.; Saraiva, N.; Degrave, W. 1999. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. *J. Parasitol.* 85: 563-568.
- Ferreira, E.C., (2005). Comparação de técnicas sorológicas para a identificação da leishmaniose visceral canina (LVC) visando a otimização do diagnóstico em inquéritos epidemiológicos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

- Ferreira E.C., de Lana M., Carneiro M., Reis A.B., Paes D.V., Silva E.S., Schallig H., Gontijo C.M. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 146(3-4):235-41.
- Ferrer, L. 2002. The pathology of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Preceedings of the second international canine leishmaniasis forum.* Sevilla, Espanha.
- Ferroglio, E.; Romano, A.; Trisciuglio, A.; Poggi, M.; Ghiggi, E.; Sacchi, P.; Biglino, A. 2006. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100(7):636-41.
- Fisa, R.; Gállego, m.; Castillejo, S.; Aisa, M.J.; Serra, T.; Riera, C.; Carrio, J.; gállego, j. & Portus, M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): The example of the Priorat focus. *Vet. Parasit.* 83: 87-97.
- Floeter-Winter, L.M. & Shaw, J.J. 2004. New horizons in the identification and taxonomy of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res. Adv. Microbiol.* 4: in press.
- Francino, O.; Altet, L.; Snachez-Robert, E.; Rodriguez, A.; Solano-Gallego, L.; Alberola, J.; Ferrer, L.; Sánchez, A.; Roura, X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasit.* 137: 214-221.
- Gaeta, G.B.; Gradoni, L.; Gramiccia, M.; di Martino, L.; Pizzuti, R.; Pempinello, R.; Scotti, S.; Maisto, A. 1994. Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recenti Prog Med.* 85(6):340-7. Review.
- Gomes, A.H.S.; Ferreira, I.M.R.; Lima, M.L.S.R.; Cunha, E.A.; Garcia, A.S.; Araújo, M.F.L.; Pereira-Chioccola, V.L. 2006. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* doi: 10.1016/j.vetpar2006.10.008.
- Gontijo, C.M.F. 2000. Leishmaniose tegumentar em Minas Gerais: estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

- Gontijo, C.M.F.; Silva, E.S.; de Fuccio, M.B.; de Sousa, M.C.; Pacheco, R.S.; Dias, E.S.; Andrade Filho, J.D.; Brazil, R.P.; Melo, M.N. 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 81(2):143-50.
- Gontijo, C.M.F.; Melo, M.N., 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 7: 338-347.
- Gradoni, L. 1999. Epizootiology of canine leishmaniosis in Southern Europe. In Killick-Kendrick, R (ed) *Canine leishmaniasis: an update.* Hoechst Roussel Vet.Wiesbaden. 339-342.
- Gramiccia, M.; Smith, D.F.; Angelici, M.C.; Ready P.D.; Gradoni, L. 1992 A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology.* 105:29-34.
- Grimaldi, G.Jr.; David, J.R.; McMahon-Pratt, D. 1987 Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 36(2):270-87.
- Guimaraes, M.C.; Celeste B.J.; Franco, E.L. 1990. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ.* 68: 39-43.
- Harith, A.E.; Kolk, A.H.; Kager, P.A.; Leeuwenburg, J.; Muga, R.; Kiugu, S. & Laarman, J.J. 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 583-586
- Hermsen, C.C.; Telgt, D.S.; Linders, E.H.; Van de Locht, L.A.; Eling, W.M.; Mensink, E.J.; Sauerwein, R.W. 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol. Biochem. Parasit.* 118: 247-251.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hockeyer, W.T.; Wellde, B.T.; Sabwa, C.L.; Smith, D.H.; Rees, P.H.; Kager, P.A.; 1984. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* London, 78(6): 489-493.

- Ikonomopoulos, J.; Kokotas, S.; Gazouli, M.; Zavras, A.; Stoitsiou, M.; Gorgoulis, V.G.; 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* 113: 99-113.
- Jauregui, L.H.; Higgins, J.; Zarlenga, D.; Dubey, J.P.; Lunney, J.K. 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2065-2071.
- Kapoor, G.S.; Arora, S.K.; Sehgal, S. 1998. Genetic polymorphism of *Leishmania* species using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism and cDNA probe of *Leishmania donovani*. *Med. Microbiol. Immunol.* 86(4):209-14.
- Killick-Kendrick, R. 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Path. Exot.* 78: 747-755.
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., e plevraki, K. J. 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis (CVL) in Greece: a retrospective study of 158 spontaneous cases. *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.* 35, 376-383.
- Lachaud, L.; Chabbert, E.; Dubessay, P.; Reynes J.; Lamothe, J.; Bastien, P. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J. Clin. Microbiol.* 39: 613-617.
- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Academic Press Inc. (London)* 1-120.
- Lainson, R. & Rangel, E. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(8):811-27.
- Leclercq, V.; Lebastard, M.; Belkaid, Y.; Louis, J.; Milon, G. 1996 The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of Immunology* 157: 4537-4545.

- Leontides, L.S.; Saridomichelakis, M.N.; Billinis, C.; Kontos, V.; Koutinas, A.F.; Galatos, A.D.; Mylonakis, M.E. 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically health dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109: 19-27.
- Logan, J.M.J.; Edwards, K.J.; Saunders, N.A.; Stanley, J. 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. By melting peak analysis of bioprobes in real-time PCR. *Jour. Clin. Microbiol.* 39: 2227-2232.
- Lopes, U.G.; Momen H.; Grimaldi Jr, G.; Marzochi, M.C.; Pacheco, R.S.; Pacheco, R.S.; Morel, C.M. 1984. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 70: 89-98.
- Madeira, M.F.; Schubach, A.; Schubach, T.M.P.; Pacheco, R.S.; Oliveira, F.S.; Pereira, S.A.; Figueiredo, F.B.; Baptista, C.; Marzochi, M.C.A. 2005. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *The Roy. Soc. Trop. Méd. and Hyg.*
- Mancianti, F.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Pieri, S. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82: 566-7
- Mancianti, F., Pedonese, F., Poli, A. 1996. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet.Parasitol* 65, 1-9.
- Manna, L.; Vitale, F.; Reale, S.; Caracappa, S.; Pavone, L.M.; Della Morte, R.; Cringoli, G.; Staiano, N.; Gravino, A.E. 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125: 251-262.
- Manna, L.; Reale, S.; Viola, E.; Vitale, F.; Manzillo, V.F.; Michele, P.L.; Caracappa, S.; Gravino, A.E. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 142(3-4): 271-80.

- Martin-Sanchez , J.; Pineda, J.A.; Morillas-Marquez, F.; Garcia-Garcia, J.A.; Acedo, C.; Macias, J. 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg.* 70(5):545-8.
- Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Souza, W.J.S.; Toledo, L.M.; Grimaldi Jr., G.; Momen, H., Pacheco, R.S.; Sabroza, P.C.; Souza, M.A.; Rangel Jr., F.B.; Tramontano, N. 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 80:349-357.
- Marzochi, M C A, Marzochi, K B F & Carvalho, R W. 1994. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, 10(1): 34-37.
- Mattner, F.; Di Padova, K.; Alber. 1997. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Imunity* 65: 4378-4383.
- Melby, P.C.; Yang, Y.Z.; Cheng, J.; Zhao, W. 1998 Regional differences in the cellular immune to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Imunity* 66:18-27.
- Michalsky, E.M. 2004. Aspectos entomológicos associados a transmissão de leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Editora MS, Brasília, 2003.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzales, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 88:491-493.
- Morales, M.A.; Ares, C.; Canavate, C.; Barker, D.C.; Alvar, J. 2001. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 104-107.

- Moreno, J. & Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 18: 399-405.
- Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, CT. 1998. Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR GREEN I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-962.
- Morrison, T.B.; Ma, Y.; Weiss, J.H.; Weis, J.J. 1999. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37: 987-992.
- Mortarino, M.; Franceschi, A.; Mancianti, F.; Bazzochi, C.; Genchi, C.; Bandi, C. 2004. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia* 46: 163-167.
- MSB (Ministério da Saúde do Brasil). 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral e Manual de controle da leishmaniose tegumentar. Em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>.
- Nasereddin, A.; Eregat, S.; Azmi, K.; Baneth, G.; Jaffe, C.L.; Abdeen, Z. 2006. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *Jour. Parasitol.* 92: 178-183.
- Nicolas, L.; Prina, E.; Lang, T.; Milon, G. 2002a. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 40:1666-1669.
- Nicolas, L.; Milon, G.; Prina, E. 2002b. Rapid differentiation of world *Leishmania* species by lightcycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J. Microbiol. Met.* 51: 295-299.
- Nicolle, C. 1908. Isolament et culture des corps de Leishman. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 3, 55-56.
- Novy, F.G. e McNeal, W.J. 1903. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: A preliminary note. *J. Amer. Med. Ass.* 41, 1266-1268.
- Oliveira, C.L., Assunção, R.M., Reis, I.A., Proietti, F.A. 2001. Spatial distribution of human and canine leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Publ.* 17:1231-1239.

- Oliveira, F.S.; Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P.; Pacheco, R.S. 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 129: 219-227.
- OMS, 1990. Lucha contra las leishmaniosis. Serie de Reports Técnicos, 193. Ginebra, pp. 29-32.
- Ozbel, Y.; Oskam, L.; Ozensoy, S.; Turgay, N.; Alkan, MZ; Jaffe, C.L.; Ozcel, M.A. 2000. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop. Jan* 74(1):1-6.
- Oskam, L.; Slappendel, R.J.; Beijer, E.G.M.; Kroon, N.C.M; C.W.; Ozensoy, S.; Ozbal, Y. & Terpstra, W.J. 1996. Dog-DAT: direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.*
- Pacheco, R.S.; Grimaldi Jr., G.; Momen, H.; Morel, C.M. 1989. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitol* 100: 393-398.
- Palatnik, C.B.; Previato, J.O.; Mendonca-Previato; L.; Borojevic, R. 1990. A new approach to the phylogeny of *Leishmania*: species specificity of glycoconjugate ligands for promastigote internalization into murine macrophages. *Parasitol Res.* 76(4):289-93.
- Piesman, J.; Schneider, B.S.; Zeidner, N.S. 2001. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdoferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1666-1669.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., e Ruitenber, J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect.Immun.* 62, 229-235.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L., e Dye, C. 1997. The epidemiology of canine leishmaniosis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115, 143-156.

- Quinnell, R.J.; Courtenay, O.; Davidson, S.; Garcez, L.; Lambson, B.; Ramos, P.; Shaw, M.A. & Dye, C. 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122: 253-261.
- Reale, S.; Maxia, L.; Vitale, F.; Glorioso, N.S.; Caracappa, S.; Vesco, G. 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2931-2935.
- Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M.G.; Mayrink, W.; França-Silva, J.C.; Giunchetti, R.C.; Genaro, O.; Corrêa-Oliveira, R. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Science* 81: 68-75.
- Reithinger, R.; Lambson, B.E.; Barker, D.C., Davies, C.R. 2000. Use of PCR to detect *Leishmania (Vianna) spp.* in dog blood and bone marrow. *J. Clin. Microbiol.* 38: 748-751.
- Reithinger, R.; Quinnell, R.J.; Alexander, B.; Davies, C.R. 2002. Rapide detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2352-2356.
- Rica-Capela, M.J.; Cortes, S.; Leandro, C.; Peleteiro, M.C.; Santos-Gomes, G.; Campino, L. 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol. Research* 89:163-169.
- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Serres, E. ; Pratloug, F.; Bastien, P.; Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 65(3):111-25.
- Rodgers, M.R.; Stephen, J. & Wirth, D.F. 1990. Amplification and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71: 267-275.
- Rolão, N.; Cortes, S.; Rodrigues, O.R.; Campino, L. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 90: 1150-1154.

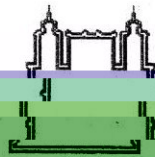
- Schallig, H.D.F.H.; Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health* 7: 641-651.
- Schonian, G.; Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig, H.D.F.H.; Presber, W.; Jaffe, C.L. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 349-358.
- Schulz, A.; Mellenthin, K.; Schonian, G.; Fleischer, B.; Drosten, C. 2003. Detection, Differentiation and Quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence Resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1529-1535.
- Shaw, J.J. 2006. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 577-579.
- Sideris, V.; Papadopoulou, G.; Dotsika, E.; Karagouni, E. 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 15: 271-276.
- Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.S.; Fiusa, V.O.P.; Brazil, R.P. 2001. Visceral Leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem inst Oswaldo Cruz*, 3: 285-91
- Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.da S.; Brazil, R.P. 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet. Mol. Res.* 3(2):251-7
- Sing, N.; Curran, M.D.; Rastogil, A.K.; Middleton, D.; Sundar, S. 1999. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. *Trop. Med. Int. Health* 4: 448-453.
- Slappendel, R.J. Canine leishmaniasis. 1988 A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q.* 10(1):1-16. Review.
- Smyth, A.J.; Ghosh A.; Hassan, Md.Q.; Basu, D.; Bruijn, M.H.L.; Adhya, S.; Mallik, K.K.; Barker, D.C. 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* 105: 183-192.

- Solano-Gallego, L.; Morell, P.; Arboix, M.; Alberola, J.; Ferrer, L. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39: 560-563.
- Stauber, L.A.; Franchino, E.M.; Grun, J. 1958. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. *J. Protozool.* 5: 269-273.
- Tafuri, W.L.; de Oliveira, M.R.; Melo, M.N.; Tafuri, W.L. 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol.* 96: 203-12
- Vitale, F.; Reale, S.; Vitale, M.; Petrotta, E.; Torina, A.; Caracappa, S. 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026: 139-143.
- Volpini, A.C. 2003. PCR-RFLP mDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- Volpini, A.C.; Passos, V.M.A.; Oliveira, G.O.; Romanha, A.J. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. 2004. *Acta Trop* 90: 31-37.
- Weigle, K.A.; Labrada, L.A.; Lozano C; Santrich C.; Barker D.C. 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 601-606.
- World Health Organization. Control of leishmaniasis. 2006. *Technical Report Series*, v. 793, p.50-52.
- World Health Organization, 1990. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization Tech. Rep. Ser. 793: 1-158.
- Zaffaroni, E.; Rubaldo, L.; Lanfranchi, P.; Migone, W. 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Vet. Parasitol.* 81: 11-19.

REFERÊNCIA ELETRÔNICA

<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>



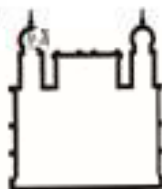


Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Oswaldo Cruz - CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº P0119-02, intitulado "Aplicação em campos
de testes de Aglutinação Direta (DAT - Direct Agglutination Test e EAST

±]



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Rene Rachou
 Laboratório de Leishmanioses
 AV. AUGUSTO DE LIMA, 1715-BARRO PRETO-BELO HORIZONTE-MG
 CEP 30.190-002-CX. POSTAL 1743-BRASIL
 FAX N.º (55-31) 3295-3115 - TEL.: (55-31) 3295-3566 RAMAL 157.

FICHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA (CANINA)

DATA ___/___/___

N.º _____

Nome do cão: _____

Raça _____ Sexo _____ Idade _____ Cor _____

Proprietário _____

Endereço _____

Tipo de residência _____

Outras localidades onde residiu: _____

Local _____ Tempo _____

Local _____ Tempo _____

Aspectos clínicos _____

Lesões _____ Número _____ Região do corpo _____

O cão viajou nos últimos seis meses (sítio, etc) _____

Origem do cão _____

Exames: _____

Diagnóstico parasitológico: mielograma _____

Diagnóstico sorológico: _____

ELISA _____ DAT _____

Local: pele _____ sangue _____

DIAGNÓSTICO MO
 MEDULA ÓSSEA

N
 R
 P
 E
 T
 U
 L
 L
 A
 L
 C
 O
 E
 EX
 DIA
 DIAGNO
 RIFI
 DIAGNÓSTICO MO
 MEDULA ÓSSEA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)