

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações,
Minerais e Materiais**

**COMPARAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS DE PCR PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM
AMOSTRAS COLETADAS POR SWAB CONJUNTIVAL**

Marcia Maria Pilatti

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais,
como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações.

Orientador: Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade.

Belo Horizonte
2009

Livros Grátis

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

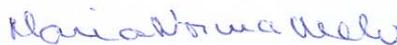
Milhares de livros grátis para download.

A presente dissertação de mestrado, intitulada “**Comparação de quatro métodos de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras coletadas por Swab conjuntival**”, de autoria de **MARCIA MARIA PILATTI**, foi defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2009 pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2009



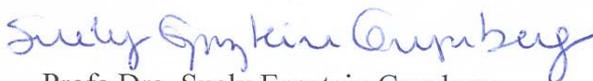
Prof. Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade
CDTN - Orientador



Profa. Dra. Maria Norma de Melo
UFMG



Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo
UFMG



Profa. Dra. Suely Epsztein Grynberg

CDTN

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
por serem inspiração para as minhas
investidas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e compreensão.

Ao meu irmão Marcos pela amizade, parceria e cumplicidade.

Ao Prof. Dr. Antero por me receber em seu laboratório, pela confiança para que pudesse realizar este trabalho, mas principalmente pelo profissionalismo e entusiasmo em orientar.

Ao Valdênio pelo amor e companheirismo, compartilhando todos esses anos os momentos bons e os difíceis. Também por ser o responsável deste acontecimento, pelo grande incentivo e por mostrar que somos capazes.

Aos amigos Guilherme e Elvira pelo grande apoio.

Ao Prof. Helder Teixeira pelo incentivo e apoio.

Ao Nino pela amizade, ajuda e boa vontade em ensinar.

Aos colegas da Radiobiologia: Estefânia, Camila, Luciana, Bárbara, Fred, Marcella, Baiano, Marina, Rodrigo, Lucilene, Henrique e demais estagiários pelo carinho e convivência.

Às amigas Érica, Vanessa Rossi, Marisa, Aline, Ângela, Rose, Andréia, Adriana, Vanessa Zanettin e Mei, que mesmo distante estiveram muito presentes, me incentivando e apoiando para que conseguisse finalizar esta etapa.

Aos colegas de turma, principalmente Fernanda e Tati pelos bons momentos compartilhados durante o curso.

Aos colegas das outras turmas pelas boas conversas.

À Valdelaine pela amizade e pela consultoria em estatística.

À Prof.^a Maria Norma de Melo pelo exemplo de profissionalismo e carisma.

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação do CDTN/CNEN, Roseli, Cerisa e Luiz Alberto que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao pessoal da biblioteca, Lenira, Nívea, Virgínia pela ajuda com os artigos via COMUT, formatações e referências bibliográficas.

Aos técnicos da Radiobiologia Zacarias, Geraldinho, Patrícia e Maria por ajudar na organização e manutenção do laboratório.

Aos professores da Pós-Graduação do CDTN/CNEN, em especial ao Prof. Maximiliano pelo incentivo.

A todos os funcionários do CDTN, amigos e familiares que de alguma forma me acompanharam nesta jornada.

À AIEA pelo suporte financeiro.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

**“Só podemos alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”
(Friedrich Nietzsche)**

**“Nenhuma atividade no bem é insignificante. As mais
altas árvores são oriundas de minúsculas sementes.”
(Chico Xavier)**

COMPARAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM AMOSTRAS COLETADAS POR SWAB CONJUNTIVAL

Marcia Maria Pilatti

RESUMO

Muitos estudos já demonstraram a aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), cujo agente etiológico no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, que é sinônimo de *Leishmania (Leishmania) infantum*. Um dos maiores obstáculos para a implementação desta técnica é a falta de padronização. Centenas de trabalhos foram publicados até o momento sobre o diagnóstico por PCR das leishmanioses, mas poucos foram realizados com a finalidade de comparar a eficiência dos diversos protocolos disponíveis. O objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de quatro métodos de PCR para o diagnóstico da LVC. As técnicas foram primeiramente testadas usando DNA purificado de promastigotas cultivados e em seguida em amostras coletadas de cães infectados pelo método do *swab* conjuntival. Todos os métodos de PCR utilizados neste trabalho apresentam duas etapas: amplificação seguida de hibridização ou de uma nova amplificação (*nested* ou *semi nested*). Dois dos métodos (kDNA PCR-Hibridização e kDNA snPCR) utilizam iniciadores endereçados aos minicírculos do cinetoplasto (kDNA) e os outros dois métodos apresentam como alvo a região codificante (LnPCR) e intergênica não codificante (ITS1 nPCR) dos genes do RNA ribossômico (RNAr). Quando foi utilizado DNA purificado de *L. (L.) chagasi* o kDNA snPCR apresentou a melhor sensibilidade detectando até 10 fg enquanto que os outros métodos detectaram até 100 fg. Estes resultados não se correlacionaram bem com os obtidos de cães infectados através do *swab* conjuntival. Dois grupos de 23 cães foram usados. No Grupo 1 o DNA foi extraído dos *swabs* pelo método do fenol-clorofórmio e no Grupo 2 por fervura. Para os cães do grupo 1 os métodos mais eficientes foram os baseados em alvos de kDNA. O kDNA PCR-Hibridização detectou parasitas em 22/23 cães (95,6%) e em 40/46 amostras (86,9%), considerando as conjuntivas direita e esquerda. O kDNA snPCR foi positivo para 21/23 cães (91,3%) e para 40/46 amostras (86,9%). As positivities destes métodos foram significativamente superiores as obtidas pelos métodos com alvos nos genes de RNAr ($p < 0,05$). O método LnPCR obteve resultado positivo em 17/23 cães (73,9%) e em 30/46 amostras (65,2%). Já o ITS1 nPCR conseguiu detectar os parasitas em 16/23 cães (69,6%) e 28/46 (60,9%) das amostras. No

grupo 2 o método kDNA PCR-Hibridização também mostrou melhor desempenho detectando parasitas em 18/23 cães (78,3%) e em 31/46 amostras (67,4%), resultado significativamente superior ($p < 0.05$) aos outros três métodos. As positivities dos métodos kDNA snPCR e LnPCR foram abaixo do esperado e estes ensaios parecem ter sofrido algum tipo de inibição relacionada ao processo de extração de DNA. A maior sensibilidade dos métodos baseados em minicírculos de kDNA descrita por outros pesquisadores foi confirmada neste estudo. O kDNA PCR-Hibridização mostrou a melhor sensibilidade entre os métodos avaliados, entretanto a escolha do melhor método vai depender do tipo de informação requerida. Como um todo, nossos resultados apóiam a aplicabilidade do método do *swab* conjuntival para diagnóstico da LVC.

Palavras-chave:

Leishmaniose Visceral canina; Reação em cadeia da polimerase (PCR); Comparação; Diagnóstico; *Swab* conjuntival.

**COMPARISON OF FOUR PCR METHODS FOR DIAGNOSIS OF CANINE
VISCERAL LEISHMANIASIS IN SAMPLES COLLECTED BY THE
CONJUNCTIVAL SWAB PROCEDURE**

Marcia Maria Pilatti

ABSTRACT

Many studies have demonstrated the applicability of Polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL). The disease in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, synonymous of *Leishmania (Leishmania) infantum*. A major concern in the development and implementation of PCR for *Leishmania* ssp. diagnosis is the lack of standardization. Many works on PCR diagnosis of leishmaniasis have been published, but very few studies have compared different protocols. The aim this work was to compare the sensitivities of four PCR methods for CVL diagnosis. The comparison was firstly accomplished using DNA purified from cultured promastigotas and then using samples collected from infect dogs by the conjunctival swab procedure. All PCR methods presented two steps: a first amplification followed by hybridization or a new amplification (nested or semi nested). Two of the methods (kDNA PCR-Hybridization and kDNA snPCR) used primers addressed to kinetoplast minicircles and the other two methods to the coding (LnPCR) and intergenic noncoding regions (ITS1 nPCR) of the ribosomal rRNA genes. The assessment using purified DNA of *L. (L.) chagasi* demonstrated that the kDNA snPCR showed the best sensitivity detecting up 10 fg while all other methods detected up to 100 fg. These results did not correlate well with those obtained from infected dogs by the conjunctival swab procedure. Two groups of 23 dogs were used. In Group 1 the DNA was extracted from cotton swabs by phenol-chloroform and in Group 2 by boiling. In the Group 1 the most efficient methods were those based on kDNA targets. The kDNA PCR-Hybridization was able detect parasites in 22/23 dogs (95.6%) and in 40/46 samples (86.9%), considering the right and the left conjunctivas. The kDNA snPCR was positive for 21/23 dogs (91.3%) and for 40/46 samples (86.9%). The positivities of kDNA based methods were significantly higher than the positivities obtained by the two methods based on ribosomal rRNA genes ($p < 0.05$). The method LnPCR was able to detect parasites in 17/23 dogs (73.9%) and 30/46 (65.2%) samples. The ITS1 nPCR was positive for 16/23 dogs (69.6%) and 28/46 (60.9%) samples. In Group 2 the kDNA PCR-Hybridization also showed the best performance. It was able to detected parasites in 18/23 dogs (78.3%) and 31/46 samples (67.4%), significantly higher

($p < 0.05$) than the other three methods. The positivities of two methods, kDNA snPCR, and LnPCR, were below than the expected and these assays seem to be undergone some kind of inhibition related to DNA extraction procedure. The higher sensitivity of the minicircle kDNA based assays reported by others was confirmed in this study. The kDNA PCR-Hybridization showed the best sensitivity among the assays evaluated, however the choice of the best method will depend on the kind of information needed. As a whole, our results support the applicability of the conjunctival swab procedure for CVL diagnosis.

Keywords:

Canine Visceral Leishmaniasis; Polymerase Chain Reaction (PCR); Comparison; Diagnosis; Conjunctival swab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama da classificação das diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	22
Figura 2: Diagrama do ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	25
Figura 3: Coleta de amostra pelo método do <i>swab</i> conjuntival.	50
Figura 4: Organograma do processo de análise das amostras coletadas das conjuntivas dos cães pelo procedimento do <i>swab</i> conjuntival para diagnóstico da leishmaniose pelos métodos de PCR.	58
Figura 5: Resultados obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização a partir de DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	62
Figura 6: Géis de agarose 2% dos produtos de kDNA snPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	63
Figura 7: Géis de agarose 2% dos produtos de LnPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	64
Figura 8: Géis de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	65
Figura 9: Resultados obtidos pelo método kDNA PCR - Hibridização a partir de DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	68
Figura 10: Géis de agarose 2% de kDNA snPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	69
Figura 11: Géis de agarose 2% dos produtos de LnPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	70
Figura 12: Géis de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	71
Figura 13: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	74
Figura 14: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	75
Figura 15: Hibridização dos produtos de PCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais dos cães do grupo 1.	76
Figura 16: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	77
Figura 17: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	78

Figura 18: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	79
Figura 19: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	80
Figura 20: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	81
Figura 21: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	82
Figura 22: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	83
Figura 23: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	84
Figura 24: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	85
Figura 25: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.	86
Figura 26: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	87
Figura 27: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.	88
Figura 28: Gel de agarose 2% da análise por RFLP dos produtos de PCR obtidos por ITS1 nPCR das amostras dos cães do grupo 1.	89
Figura 29: Porcentagem de cães positivos do grupo 1 na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.	91
Figura 30: Porcentagem das amostras positivas do grupo 1 na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.	92
Figura 31: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	94
Figura 32: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	95
Figura 33: Hibridização com produtos de PCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais dos cães do grupo 2.	96
Figura 34: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	97

Figura 35: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	98
Figura 36: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	99
Figura 37: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2. ...	100
Figura 38: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	101
Figura 39: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	102
Figura 40: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	103
Figura 41: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	104
Figura 42: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	105
Figura 43: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.	106
Figura 44: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	107
Figura 45: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos <i>swabs</i> conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.	108
Figura 46: Gel de agarose 2% da análise por RFLP dos produtos de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR das amostras dos cães do grupo 2.	109
Figura 47: Porcentagem de cães positivos do grupo 2 na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.	111
Figura 48: Porcentagem das amostras positivas do grupo 2 na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sensibilidade dos métodos utilizando-se uma diluição seriada de DNA de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	61
Tabela 2: Sensibilidade dos métodos utilizando-se uma diluição seriada de DNA de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	67
Tabela 3: Resultados dos <i>swabs</i> conjuntivais dos cães do grupo 1	90
Tabela 4: Resultados dos <i>swabs</i> conjuntivais dos cães do grupo 2.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain-heart infusion</i>
DAT	Teste de aglutinação direta
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanina trifosfato
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfato
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAST-ELISA	<i>Falcon Assay Screening Test – Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
gp63	Glicoproteína de 63 kilodaltons
gp70	Glicoproteína de 70 kilodaltons
hsp70	<i>70KDa Heat shock protein</i> (Proteína de Choque Térmico de 70 kiloDaltons)
ITS1	<i>Internal transcribed spacer 1</i> (região espaçadora interna transcritível 1)
ITS1 nPCR	<i>Internal transcribed spacer 1 nested PCR</i>
Kb	Kilobase
kDNA	DNA de cinetoplasto
kDNA snPCR	DNA de cinetoplasto semi <i>nested PCR</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LnPCR	<i>Leishmania nested PCR</i>
LSU rRNA	<i>Large subunit ribosomal RNA</i>
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
³²P	Fósforo trinta e dois
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	ácido ribonucléico

SDS	Sulfato dodecil de sódio
SSC	<i>Solution of Sodium Citrate</i> (Solução de citrato de sódio)
SSU rRNA	<i>Small subunit ribosomal</i> RNA (subunidade ribossômica menor do RNA ribossômico)
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
fg	Fentograma
g	Gravidade
J	Joules
MeV	Megaeletronvolt
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
m/v	massa/volume
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomoles
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
V	Volt
v/v	volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitros
ng	Nanograma

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS	XVII
1) INTRODUÇÃO	20
1.1) O agente etiológico e o ciclo de transmissão	21
1.2) Hospedeiros.....	26
1.3) Classificação e manifestações clínicas das leishmanioses	27
1.4) Epidemiologia da Leishmaniose visceral no Brasil	28
2) REFERENCIAL TEÓRICO	31
2.1) MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	32
2.1.1) kDNA PCR - Hibridização.....	36
2.1.2) kDNA semi <i>nested</i> PCR.....	37
2.1.3) <i>Leishmania nested</i> PCR (LnPCR).....	38
2.1.4) <i>Internal transcribed spacer 1 nested</i> PCR (ITS1 nPCR).....	39
3) JUSTIFICATIVA	40
4) OBJETIVOS	46
4.1) Objetivo Geral	47
4.2) Objetivos específicos.....	47
5) MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1) Diluição seriada de DNA de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	49
5.2) Cães	49
5.3) Coleta de amostras	49
5.4) Extração de DNA por fenol-clorofórmio	51
5.5) Extração de DNA por fervura	51
5.6) MÉTODOS DE PCR.....	52
5.6.1) kDNA PCR – Hibridização	52
5.6.1.1) PCR	52

5.6.1.2) <i>Dot Blot</i> e Hibridização.....	53
5.6.2) kDNA semi <i>nested</i> PCR (kDNA snPCR)	54
5.6.3) <i>Leishmania nested</i> PCR (LnPCR).....	55
5.6.4) ITS1 <i>nested</i> PCR (ITS1 nPCR).....	56
5.6.4.1) <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	56
5.7) Análise estatística.....	57
6) RESULTADOS	59
6.1) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	60
6.2) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se DNA purificado de promastigotas cultivados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	66
6.3) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se o DNA de amostras clínicas, obtidas pelo método do <i>swab</i> conjuntival, e extraído pelo método de fenol-clorofórmio (GRUPO 1).....	72
6.4) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se o DNA de amostras clínicas, obtidas pelo método do <i>swab</i> conjuntival, e extraído pelo método de fervura (GRUPO 2).....	93
7) DISCUSSÃO	113
8) CONCLUSÕES	120
9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXO A: Artigo aceito para publicação	134

1) INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Essas doenças afetam vários animais e humanos, principalmente em regiões pobres do planeta. Atualmente é um grande problema para a saúde pública devido a sua expansão para grandes centros urbanos.

Durante as últimas décadas observou-se um aumento no número de casos de todas as formas de leishmanioses pelo mundo, o que levou a enfermidade a ser considerada por muitos especialistas como uma doença emergente em algumas áreas e reemergente em outras (ASHFORD *et al.*, 2000). Dentre os vários fatores que contribuem para a expansão das leishmanioses estão a migração para áreas urbanas devido a pressão econômica e social, o desmatamento, o processo de urbanização crescente e a susceptibilidade de humanos a infecções devido a causas como imunossupressão e a má nutrição (DESJEUX, 2001).

Estima-se que aproximadamente 14 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo além de outras 350 milhões estarem expostas a situações de risco. Anualmente são notificados 2 milhões de casos novos, sendo que 1,5 milhão referem-se a leishmaniose cutânea e 500 mil a leishmaniose visceral. Atualmente 88 países são considerados endêmicos sendo que: 90% dos casos de Leishmaniose visceral se concentram em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria; 90% dos casos de Leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2008).

1.1) O agente etiológico e o ciclo de transmissão

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanossomatídeos da ordem Kinetoplastida, que apresentam como característica uma estrutura de DNA associada à mitocôndria chamado de cinetoplasto (kDNA). Dentro deste grupo os responsáveis pela enfermidade são os protozoários do gênero *Leishmania*, que apresenta até o momento em torno de 30 espécies e destas 10 ou mais têm importância médica e veterinária (BATES; ASHFORD, 2006; LAINSON; SHAW, 2006). As espécies se agrupam em complexos sendo classificadas em dois subgêneros conforme mostra a FIG. 1.

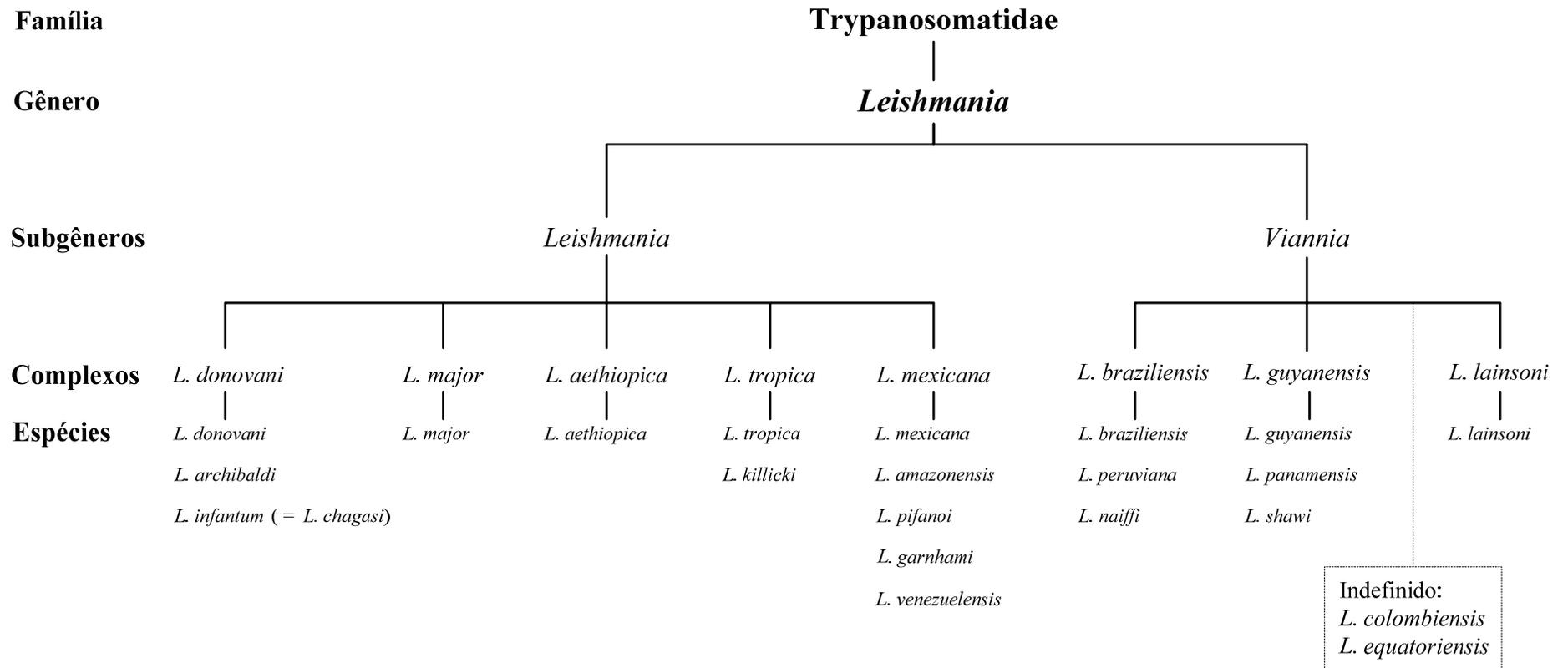


Figura 1: Diagrama da classificação das diferentes espécies de *Leishmania*.
 Fonte: RODRIGUES, 2006.

Todas as espécies de *Leishmania* se apresentam na forma amastigota (aflagelada – onde o flagelo é interno e não funcional) em células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados e na forma promastigota (flagelada) no tubo digestivo de flebotomíneos.

As espécies responsáveis pela transmissão das leishmanioses são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos como flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* (novo mundo) e *Phlebotomus* (velho mundo) (DESJEUX, 1996; GRIMALDI; TESH, 1993). São registrados atualmente em torno de 700 espécies de flebótomos, aproximadamente 10% destes têm sido incriminados como vetores das leishmanioses, mas apenas 30 espécies têm demonstrado capacidade vetorial (LANE, 1993). Cada espécie de flebótomo pode transmitir uma determinada espécie de *Leishmania*, que leva a um tipo particular de doença (BATES, 2007).

A transmissão é freqüentemente zoonótica onde os parasitas são transmitidos para o homem, a partir de mamíferos infectados, através da picada de fêmeas de flebótomos. Na Índia, África e Ásia ocorre também a transmissão antroponótica onde os parasitas, das espécies *Leishmania tropica* e *Leishmania donovani* (BATES, 2007), são transmitidos pelos flebótomos a partir de humanos infectados (WHO, 2008).

No ciclo de transmissão a fêmea do flebótomo ingere os parasitas, presentes na pele na forma amastigota, quando se alimenta do sangue dos reservatórios infectados. Devido à diminuição da temperatura em relação ao hospedeiro vertebrado e ao aumento de pH no intestino do inseto as formas amastigotas se transformam em promastigotas. Essas passam por várias transformações no interior do intestino do inseto até atingir a forma promastigota metacíclica, que é a forma infectante. Este processo ocorre entre uma a duas semanas (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006). Após esse período o flebótomo infectado ao se alimentar novamente inocula na pele dos hospedeiros as formas promastigotas metacíclicas, sendo estas fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Após a interiorização, ocorre a fusão entre os lisossomos e o fagossomo. O parasita, adaptando-se ao novo ambiente, transforma-se em amastigota. Essa forma consegue se desenvolver e multiplicar, por divisão binária simples, no meio ácido existente dentro do vacúolo digestivo. Após a proliferação provocam lise das células fagocitárias, sendo liberadas e fagocitadas por novas células do sistema mononuclear fagocitário. A disseminação das formas amastigotas através dos sistemas linfático e vascular ocorre com o auxílio de células do sistema mononuclear fagocitário, possibilitando dessa forma a infecção de outros monócitos e

macrófagos do sistema retículo-endotelial (FIG. 2) (LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006; NEVES, 2006; PETERS, 2008; RITTING; BOGDAN, 2000; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992).

O período de incubação da *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados varia de algumas semanas a vários meses, isso se deve a alguns fatores como a virulência da cepa do parasita, características genéticas do paciente, seu estado nutricional e imunogênico, além da dose do inóculo infectante (GRIMALDI; TESH, 1993; NEVES, 2006).

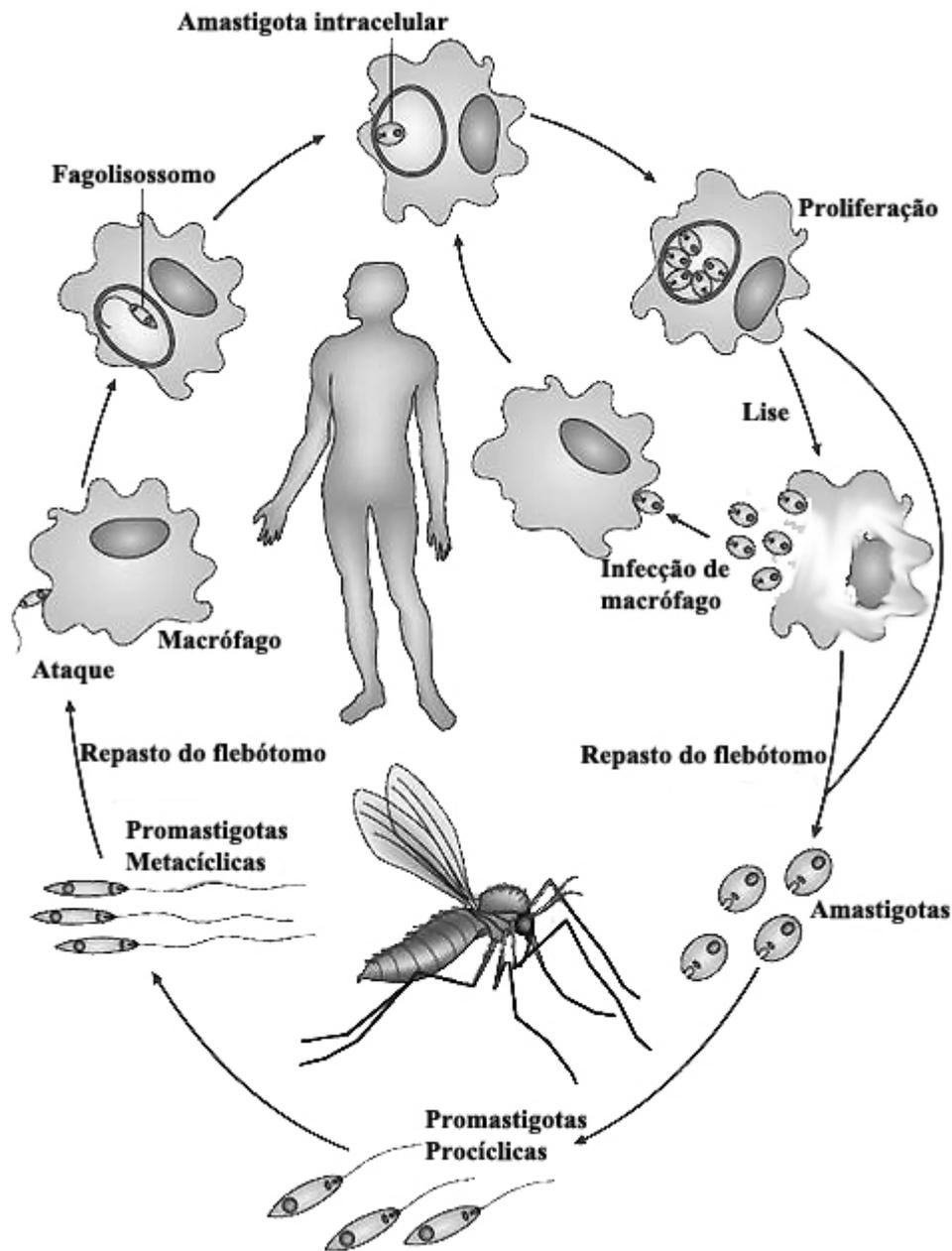


Figura 2: Diagrama do ciclo de vida de *Leishmania*.

No momento do repasto o flebótomo ingere as formas amastigotas presentes no hospedeiro. Essas se transformam em promastigotas no interior do intestino do inseto. A forma promastigota é inoculada na pele pela picada da fêmea de flebótomo. Uma vez transmitidos, os parasitos são fagocitados por células dendríticas e macrófagos na derme, onde perdem seu flagelo se transformando na forma amastigota. Os amastigotas se multiplicam, destroem a célula do hospedeiro e infectam outras células fagocitárias.

Fonte: HANDMAN, 2001.

1.2) Hospedeiros

Os hospedeiros são importantes para a manutenção do ciclo de vida de todas as espécies de *Leishmania*. Atuam como reservatórios mamíferos pertencentes às ordens: Edentata (ex: tatu, preguiça), Carnívora (ex: cães, gatos), Hyracoidea, Rodentia (ex: ratos), Primatas (ex: humanos, macacos), Marsupialia (ex: gambá) e Perissodactyla (ex: cavalos) (ASFHORD, 1996; GRAMICCIA; GRANDONI, 2005; SALIBA; OUMEISH, 1999).

Dentre esses reservatórios o foco das atenções está voltado para o cão, que é considerado o principal hospedeiro do ambiente doméstico para *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agente causador da Leishmaniose visceral no Brasil.

Alguns pesquisadores vêm estudando este assunto e levantaram algumas explicações para isso. Segundo Moreno e Alvar (2002) algumas raças de cães parecem ser mais resistentes à infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*, mas os cães de modo geral são susceptíveis a esta enfermidade. Além disso, constataram que alguns cães infectados por leishmaniose visceral podem permanecer assintomáticos por anos e até por sua vida inteira.

Dantas-Torres *et al.* (2006) verificaram que em áreas onde a leishmaniose visceral é endêmica a prevalência da infecção em cães por *L. (L.) infantum* é elevada, com uma grande proporção de cães assintomáticos.

Deane & Deane (1955) afirmam em seu trabalho que os cães podem aumentar a possibilidade de transmissão por apresentar um intenso parasitismo cutâneo por amastigotas de *Leishmania*.

Segundo Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006), os cães favorecem a manutenção do ciclo de transmissão doméstico de *L. (L.) infantum*, pois estão próximos ou dentro das residências.

Estes fatos indicam que cães infectados são fontes de infecção para os flebótomos da espécie *Lutzomia longipalpis* (DEANE; DEANE, 1955), que podem facilmente se adaptar ao ambiente peridoméstico ou às habitações humanas (FELICIANGELI, 2004; KILLICK-KENDRICK, 1999; LAINSON; RANGEL, 2005).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença sistêmica crônica e possui uma característica importante, permanece clinicamente inaparente por longos períodos. A fase inicial é caracterizada por ser assintomática, que eventualmente progride para uma fase

latente, apresentando-se oligossintomática ou polissintomática e finalmente podendo levar o hospedeiro a óbito (SANTOS-GOMES, *et al.*, 2003).

De acordo com os sinais clínicos, Mancianti *et al.*, 1988 classificaram os cães infectados por *L. infantum* como: sintomáticos, os que apresentam mais de três sinais clínicos; oligossintomáticos, os que apresentam de um a três sinais clínicos e os assintomáticos, os que não apresentam sinais clínicos.

Os sinais clínicos freqüentemente apresentados são: perda de peso, feridas pelo corpo, onicogrifose, conjuntivite, perda de pêlos, linfadenomegalia, esplenomegalia, hiperplasia e hipertrofia do fígado e rins.

Estima-se que aproximadamente 50% dos cães infectados com LVC não mostram sinais clínicos da doença (ABRANCHES *et al.*, 1991), mas constituem fonte de infecção para o inseto vetor e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (ALVAR *et al.*, 1994; MOLINA *et al.*, 1994; PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001).

1.3) Classificação e manifestações clínicas das leishmanioses

De acordo com o quadro clínico apresentado em humanos as leishmanioses foram agrupadas da seguinte forma:

a) Leishmaniose visceral (LV) ou calazar: nesta forma da doença o parasita tem acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides. Os primeiros sintomas são vagos e gerais, tais como febre, mal estar, apatia, anorexia, ligeira esplenomegalia e eosinofilia. Com o evoluir da doença, esses sintomas se agravam, especialmente a febre e a esplenomegalia que pode vir acompanhada de hepatomegalia. O paciente pode permanecer nesse quadro durante algum tempo ou vir a falecer em estado de caquexia, por envolvimento de outras doenças. A taxa de mortalidade entre pacientes não tratados é superior a 95%. As espécies de *Leishmania* causadoras da LV pertencem ao Complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON E SHAW, 1987), sendo *L. (L.) chagasi* a responsável pelos casos na América Latina (NEVES, 2006).

b) Leishmaniose cutânea (LC): caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas, únicas ou múltiplas, ulceradas ou não. Devido ao quadro imunoinflamatório, há formação de um nódulo

no local da picada do *Lutzomyia*, sendo que este pode regredir e curar-se espontaneamente, permanecer estacionário por algum tempo ou evoluir para úlceras. As espécies envolvidas no Brasil pertencem aos complexos *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (NEVES, 2006).

c) Leishmaniose cutânea difusa: inicialmente há formação de uma única lesão no local da picada do flebótomo. Devido à evolução lenta, após alguns anos, ocorrem metástases múltiplas, não-ulceradas por todo o corpo. Esta forma disseminada da doença ocorre em pacientes com resposta imunológica deficiente, ou mesmo em pacientes que tiveram calazar, trataram-se e algum tempo depois manifestaram essa forma difusa. A espécie causadora no Brasil é *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (NEVES, 2006).

d) Leishmaniose mucocutânea: caracterizada por lesões primárias em forma de úlceras e lesões secundárias tardias, destrutivas de mucosas e cartilagens faciais, atingindo principalmente nariz, faringe, boca e laringe. Os primeiros sintomas assemelham-se a processos irritativos da mucosa nasal como coriza, alergia e traumatismo leve. Em seguida acentua-se o edema, a obstrução nasal, o eritema e o infiltrado inflamatório no septo nasal, com corrimento. Com o passar dos meses, a lesão inicial destrói todo o nariz e atinge a região orofaríngea e laríngea, provocando complicações respiratórias por infecções secundárias, podendo levar o paciente à morte. A principal espécie responsável é a *L. (V.) braziliensis* (NEVES, 2006).

1.4) Epidemiologia da Leishmaniose visceral no Brasil

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro ou reservatório igualmente susceptível.

A leishmaniose visceral atinge 19 dos 27 estados brasileiros especialmente a região Nordeste, onde se concentram em torno de 77% dos casos humanos da doença. Há focos importantes também nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, sendo que nas duas últimas décadas tem havido um crescente aumento da incidência. Recentemente a doença vem se expandindo para novas áreas urbanas e periurbanas e se transformando em um sério problema de saúde pública, com o registro de casos em grandes centros urbanos como Belo Horizonte,

Fortaleza, Terezina e Campo Grande (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância Sanitária, Belo Horizonte é hoje o terceiro município brasileiro mais afetado pela LV ficando atrás somente de Fortaleza e Campo Grande (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Um dos fatores importante na expansão da leishmaniose visceral para áreas urbanas é a migração humana, envolvendo o transporte de cães infectados para regiões onde o inseto vetor já existe (ARIAS *et al.*, 1996). Em estudos sobre epidemias urbanas foi observado que em algumas áreas a Leishmaniose visceral canina precedeu ao aparecimento da doença humana (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001). A porcentagem de cães infectados em regiões endêmicas de LVC varia de 1% a 67% (COUTINHO *et al.*, 1985; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996). Isso exige o estabelecimento de medidas mais eficazes de controle.

Atualmente são utilizadas três medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde: tratamento precoce das pessoas infectadas, controle dos vetores com aplicação de inseticida nas casas e a eutanásia dos cães infectados (PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001). Esse programa de controle apresenta sérios problemas em relação a sua aplicabilidade. Em primeiro lugar temos a dificuldade da eliminação dos vetores nas áreas atingidas. Outra questão é o elevado custo para a manutenção desse sistema por longos períodos, pois é necessário um sistema de vigilância permanente, com utilização extensiva de recursos humanos e financeiros, o que limita sua sustentabilidade e cobertura. Temos ainda a resistência dos proprietários de cães à eutanásia, pois estes não entendem porque cães aparentemente saudáveis, mas sorologicamente positivos devam ser condenados à morte. Muitos proprietários burlam o sistema de vigilância escondendo seus cães ou transferindo-os para outras áreas, mantendo assim uma fonte de contaminação para flebotomíneos. Outros fatores, como a possibilidade de transmissão por cães assintomáticos, a má qualidade dos procedimentos de diagnósticos, e a própria dinâmica populacional canina, com rápida aquisição de infecção por novos cães introduzidos em substituição aos cães eliminados, podem influir na inefetividade da eliminação canina (COSTA; VIEIRA, 2001; COUTERNAY *et al.*, 2002; DYE, 1996).

A eutanásia de cães gera controvérsias quanto a sua eficiência. Ashford *et al.* (1998) realizaram um estudo avaliando o efeito da remoção de cães infectados na incidência da leishmaniose visceral em uma região endêmica na Bahia. Os resultados mostraram que a remoção de cães soropositivos é uma medida insuficiente para a erradicação da leishmaniose

visceral em cães, pois continuou havendo transmissão para cães mesmo com a remoção dos infectados. Por outro lado houve uma diminuição na incidência dos casos leishmaniose visceral humana. Eles acreditam que a manutenção da infecção de cães se deva a outros reservatórios ou que os métodos sorológicos são inadequados para a detecção de todos os cães infectados, que podem ser fonte de parasitas para flebótomos.

Outros estudos mostram que a eliminação de cães infectados juntamente com a borrifação intradomiciliar causaram uma diminuição em 80% da incidência de infecção por *Leishmania chagasi*. A remoção de cães infectados estaria reduzindo a disponibilidade de fontes de infecção para flebotomíneos, limitando a capacidade destes vetores em transmitir o parasita para humanos (COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007).

Tendo em vista este cenário o diagnóstico da leishmaniose canina é uma etapa fundamental no controle da enfermidade.

2) REFERENCIAL TEÓRICO

2.1) MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LVC é realizado com base nos aspectos clínicos, epidemiológicos e em testes laboratoriais. As técnicas utilizadas para diagnosticar LVC são divididas em técnicas de imunodiagnóstico, que detectam a resposta humoral, e em métodos diretos e indiretos de detecção do parasita.

Os métodos de imunodiagnóstico mais utilizados são imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta (DAT) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

A RIFI é considerada o padrão ouro do diagnóstico sorológico. Este teste, que usa o extrato bruto do parasita como antígeno, é útil em estudos epidemiológicos, na prática clínica e no acompanhamento do tratamento (ALVAR *et al.*, 2004; GRADONI, 2002; MANCIANTI *et al.*, 2002). Entretanto esta aplicação requer um alto nível de habilidade, experiência e recursos laboratoriais de custo elevado. Outra limitação é a necessidade da utilização de diluições seriadas do soro, o que torna o teste laborioso e pouco prático para utilização com grande número de amostras. A sensibilidade da RIFI em detectar cães infectados varia de 21,6% (SILVA *et al.*, 2001a) até 100% (CIARAMELLA *et al.*, 1997). A RIFI é útil do ponto de vista clínico, mas pode subestimar a taxa de infecção de *Leishmania* na população de cães em áreas endêmicas (ALVAR *et al.*, 2004).

O teste de ELISA é útil para análise de laboratório, aplicações de campo e para examinar um grande número de amostras em um curto período de tempo. Além disso, é muito versátil, pois a técnica é facilmente adaptada para usar com vários antígenos tais como, citoplasma total, antígenos purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes (MAIA; CAMPINO, 2008). O antígeno mais utilizado é o extrato bruto solúvel, mesmo apresentando reação cruzada com outras doenças (REITHINGER *et al.*, 2003; SUNDAR; RAÍ, 2002). A sensibilidade e especificidade desse método são muito influenciadas pelo antígeno utilizado (SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

O teste de aglutinação direta (DAT) utiliza promastigotas inteiros corados, podendo estes estar em suspensão ou liofilizados. Por ser um método simples e barato é amplamente defendido por pesquisadores para ser utilizado em estudos de campo (MEREDITH *et al.*, 1995; NEOGY *et al.*, 1992; SCHALLIG *et al.*, 2002a). Dentre as limitações do DAT está o longo tempo de incubação (18 h) e o fato de utilizarem diluições seriadas de sangue ou soro, o que torna o teste trabalhoso e inadequado para examinar um grande número de amostras (HARITH *et al.*, 1989). Apesar disso o desenvolvimento de um antígeno liofilizado torna o

DAT adequado para uso em condições extremas, pois permanece estável a altas temperaturas (MEREDITH *et al.*, 1995; SCHALLIG *et al.*, 2002b).

Os métodos sorológicos apresentam alguns problemas dentre eles podemos destacar a dificuldade em diferenciar uma infecção parasitária atual de uma anterior. Também não conseguem correlacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença. O custo da produção de antígenos específicos purificados é geralmente muito alto e conseqüentemente preparações com antígenos brutos são freqüentemente utilizadas, reduzindo a especificidade e a sensibilidade (SINGH, 1997).

Entre os métodos de detecção direta do parasita os mais utilizados são a microscopia e a cultura. A microscopia consiste na observação direta da *Leishmania*, na forma amastigota livre ou no interior das células do sistema mononuclear fagocitário, em lâminas coradas com Giemsa ou Leishman. Na cultura as formas promastigotas são cultivadas em meios específicos e em condições de temperatura adequadas ao seu desenvolvimento. Nem todas as espécies de *Leishmania* crescem ao mesmo tempo e nem todos tecidos e órgãos de um mesmo indivíduo possuem semelhante carga parasitária. Para aumentar e melhorar a sensibilidade de detecção do parasita, a cultura *in vitro* deveria ser realizada com diferentes tecidos e a inoculação deveria ser em replicata (EVANS, 1989).

Tanto para a microscopia quanto para cultura normalmente são utilizadas amostras obtidas por métodos invasivos como biopsias de linfonodo ou medula óssea e geralmente não são úteis para a detecção de parasitas em cães assintomáticos. Mesmo sendo um método rápido e barato, a principal desvantagem da microscopia é que o resultado depende da exigência de pessoal treinado, fazendo com que o método seja de difícil utilização em estudos de campo quando um grande número de amostras precisa ser analisado em um curto período de tempo. Além disso, podem fornecer resultados falsos negativos porque sua sensibilidade depende da quantidade de parasitas presentes na amostra, ou resultado falso positivo porque outros artefatos podem ser visualizados podendo ser erroneamente considerado como amastigota (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH; AROCH, 2008; GOMES *et al.*, 2008). Esse método também não permite a distinção de espécies de *Leishmania* (ARANSAY *et al.*, 2000; REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.* 2001a). O cultivo de promastigotas embora 100% específico apresenta problemas referentes à demora em obter o resultado, a dificuldade em isolar parasitas selvagens no meio de cultura, a dependência da quantidade de parasitas presentes no material e das possíveis contaminações microbianas que inviabilizam a obtenção do resultado. Uma cultura é considerada negativa após quatro sucessivas subculturas

negativas. Isso torna o método caro e inapropriado para diagnóstico (ALVAR *et al.*, 2004; MAIA; CAMPINO, 2008; SINGH, 1997).

Dentre os métodos indiretos de detecção do parasita estão a hibridização com sondas de DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo essa considerada de grande sucesso devido a sua alta sensibilidade e especificidade.

Na hibridização com sondas de DNA, a amostra é processada de forma a obter o DNA do parasita que é fixado a um suporte, normalmente papel de nitrocelulose ou membrana de nylon. O DNA da sonda pode ser DNA genômico, um oligonucleotídeo ou um fragmento de DNA que tenha sido clonado em um vetor como, por exemplo, um plasmídeo. Antes de realizar a hibridização é necessário desnaturar o DNA do parasita e o DNA da sonda. No momento da hibridização o DNA da sonda reconhece e se anela à seqüência alvo do DNA do parasita, sob condições de alta estringência para garantir que a sonda hibridize especificamente com a seqüência complementar do DNA do parasita. A seqüência alvo do parasita deve ser espécie-específica ou gênero-específico, não deve ser polimórfica ou variável, para evitar falsos negativos devido ao não pareamento, e é ideal que se apresente em múltiplas cópias para aumentar a sensibilidade de detecção. A sonda para ser detectada normalmente é marcada com um traçador, dentre eles podemos citar o isótopo radioativo do fósforo (^{32}P), que é detectado através da exposição a um filme de raio X, a biotina (material não radioativo), que é detectada pela conjugação da avidina ou streptavidina à enzimas como a fosfatase alcalina, e por enzimas que são detectadas usando substratos cromogênicos os quais a enzima converte em produtos coloridos insolúveis (SINGH, 1997). A hibridização com sondas marcadas com material radioativo é mais sensível quando comparada à que utiliza sondas não radioativas (MIFFLIN *et al.*, 1987; VALETINE; STEINMANN; ARNOLD, 1991). A sensibilidade das sondas marcadas com radioisótopos tem demonstrado ser de 10 a 50 vezes maior do que as que utilizam biotina (DAR; KHAN, 2004; MOLDEN *et al.*, 1985; VALETINE; STEINMANN; ARNOLD, 1991) e 100 vezes maior das sondas marcadas com fosfatase alcalina (VALETINE; STEINMANN; ARNOLD, 1991). Além da sensibilidade e especificidade outra vantagem em se utilizar sondas radiomarcadas é o menor custo quando comparado aos outros métodos (DAR; KHAN, 2004). Quanto à segurança, essa não é uma limitação ao uso de radioisótopos. Para isso é necessário que o laboratório tenha certificação, equipamentos de proteção, normas para uso e disposição dos rejeitos radioativos e treinamento apropriado dos integrantes (DAR; KHAN, 2004). É importante lembrar que os

materiais não radioativos apresetam alguns problemas: podem provocar alergia e alguns são potencialmente carcinogênicos (ADAM *et al.*, 1990; EPE *et al.*, 1992).

A PCR é o método que permite a amplificação de regiões específicas do DNA com o uso de uma enzima termoestável, a *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Com essa enzima a seqüência alvo do DNA pode ser amplificada em até um milhão de vezes após sucessivos ciclos, sendo que estes consistem de três passos. No primeiro passo o DNA é desnaturado, produzindo duas fitas simples de DNA. No segundo passo ocorre o anelamento, onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam às seqüências complementares do DNA alvo. O terceiro passo consiste na extensão das novas fitas formadas, é neste passo que a enzima adiciona às novas fitas os desoxinucleotídeos trifosfatos presentes na solução. Cada um destes passos ocorre em temperaturas bem definidas, a desnaturação ocorre a 94°C, a extensão ocorre a 72°C e a temperatura de anelamento vai depender do comprimento e do conteúdo dos oligonucleotídeos usados na PCR. Antes de fazer a reação é necessário obter o DNA do parasita, o que é realizado através de método de extração, que pode ser conduzido utilizando-se substâncias químicas ou simplesmente através de fervura. Este passo é muito importante e às vezes influencia muito na obtenção dos resultados, é aqui que devem ser removidos os inibidores da PCR, como por exemplo, a heparina utilizada na coleta de sangue e também a hemoglobina (SINGH, 1997).

Devido à elevada sensibilidade a técnica de PCR se torna muito adequada para procedimentos de diagnóstico. A sensibilidade e a especificidade da PCR estão diretamente ligadas ao conjunto de iniciadores utilizados para a amplificação do alvo, ao número de cópias do alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH; AROCH, 2008; CORTES *et al.*, 2004). Os métodos de PCR utilizados para *Leishmania* são confiáveis para determinar a presença e identificar o parasita, não somente em casos ativos da doença, mas também para monitorar os pacientes após quimioterapia (MAIA; CAMPINO, 2008). A reação pode ser realizada a partir de diferentes tipos de amostras biológicas, como por exemplo, material de biopsias, aspirados de linfonodo, medula óssea ou baço, células de meio de cultura, camada leucocitária, sangue coletado em papel filtro (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003), e mais recentemente esfregaço de conjuntiva (FERREIRA *et al.*, 2008; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). Além da possibilidade de utilizar várias amostras clínicas apresenta como outras vantagens a habilidade de trabalhar com pequenas quantidades de material a ser analisado e ser capaz de detectar níveis baixos de parasitas nas amostras (TAVARES; FERNANDES;

MELO, 2003). Os alvos de escolha normalmente são constituídos por seqüências repetitivas e/ ou polimórficas. Atualmente são utilizados como alvos de amplificação do genoma de *Leishmania* minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) (com aproximadamente 10000 cópias por célula)(RODGERS *et al.*, 1990; SMYTH *et al.*, 1992), os minixons dos genes de RNA (100-200 cópias por célula) (FERNANDES *et al.*, 1994), as seqüências dos genes da pequena subunidade ribossomal com aproximadamente 160 cópias por célula (MEREDITH *et al.*, 1993; VAN EYS *et al.*, 1992), a β -tubulina, o locus gp63, o locus hsp70, as seqüências dos genes das cisteino proteinases (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SINGH, 2006) e a ITS1 (40 – 200 cópias por célula) (SCHÖNIAN *et al.*, 2003; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). O kDNA tem sido considerado um dos melhores alvos para PCR sendo que podem ser amplificados os minicírculos completos ou somente suas regiões conservadas (GONTIJO; MELO, 2004).

Nosso objetivo neste trabalho é realizar um estudo comparativo entre metodologias de PCR usualmente utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose, utilizando-se amostras obtidas de cães sintomáticos usando o método do *swab* conjuntival, padronizado no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) (FERREIRA *et al.*, 2008). Neste método um *swab* estéril é utilizado para realização de um esfregaço nas conjuntivas oculares dos animais. São vantagens deste método ser simples, não invasivo, não traumático e livre de stress para os cães.

As seguintes metodologias serão comparadas:

2.1.1) kDNA PCR - Hibridização

Dos diferentes alvos moleculares existentes para detectar e identificar *Leishmania* o kDNA tem sido o alvo de escolha em muitos laboratórios. Isso porque é composto por maxi e minicírculos, sendo que os maxicírculos apresentam de 20 - 40 kb e estão presentes em 30 a 50 cópias, já os minicírculos medem 1 kb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias. Os minicírculos de *Leishmania* mostram características que os tornam quase ideais como sondas moleculares, pois eles estão presentes no cinetoplasto em elevado número e contém uma região conservada de no mínimo 120 pb que pode ser evidenciada em cada molécula (ROGERS; WIRTH, 1987).

O método de PCR associado à hibridização com sondas de DNA foi o primeiro procedimento em biologia molecular para *Leishmania* a ser desenvolvido para fins diagnósticos que possibilitou resultados mais precisos (HEADINGTON *et al.*, 2002).

Neste trabalho o método de PCR utilizado se baseia na amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA seguida pela hibridização dos produtos de PCR com sondas de minicírculos clonados de *L. chagasi* marcadas com ^{32}P (DEGRAVE *et al.*, 1994). O processo de hibridização normalmente utiliza as técnicas *Dot-Blot* ou *Southern Blot*, que tem como base a transferência de DNA desnaturado para membranas de nylon ou nitrocelulose, a qual recebe posteriormente as sondas marcadas com radioisótopos como o ^{32}P . Após a autoradiografia é feita a revelação e a verificação dos resultados (BOZZA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2004). Dentre as vantagens das técnicas que utilizam marcação isotópica de DNA podemos citar o aumento da sensibilidade e a simplicidade da detecção do sinal emitido pela radiação (DAR; KHAN, 2004), já que o ^{32}P é um emissor de partículas β (energia máxima de 1,7 Mev) (TURNER, 1995). Este radioisótopo possui meia vida curta de 14,7 dias, minimizando o problema da disposição do rejeito radioativo (DAR; KHAN, 2004).

A hibridização com sondas de minicírculos permite a distinção dos subgêneros de *Leishmania*, fato já demonstrado em estudos pioneiros onde o uso de sondas de kDNA permitiu a distinção entre os complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana* (ROGERS; WIRTH, 1987). A detecção secundária com sondas específicas para identificação dos produtos de PCR é altamente desejável, uma vez que permite um aumento na especificidade do método e eleva em 10 vezes a sensibilidade (FERNANDES *et al.*, 1996).

2.1.2) kDNA semi *nested* PCR

Nos minicírculos de kDNA de *Leishmania* além da região conservada existe uma região variável, que organiza os minicírculos em no mínimo 10 classes diferentes (DEGRAVE *et al.*, 1994).

Baseado no método descrito por Morales *et al.* (2002), são utilizadas duas amplificações, sendo que um dos iniciadores utilizados na primeira amplificação é novamente usado na segunda (semi *nested*). Os iniciadores são endereçados para a região variável dos minicírculos de kDNA. Este método é específico para o gênero *Leishmania*, porém não permite a discriminação entre espécies.

2.1.3) *Leishmania nested* PCR (LnPCR)

Nesta técnica são realizadas duas ampliações (*nested*), utilizando-se iniciadores endereçados para a região do gene do RNA da subunidade ribossômica menor (SSU rRNA). A primeira amplificação gera um produto comum para os membros da ordem Kinetoplastida e a segunda um produto específico para o gênero *Leishmania*.

O interesse pela seqüência SSU rRNA se deve às múltiplas cópias. O DNA nuclear contém aproximadamente 160 cópias do gene SSU rRNA (LEON; FOUTS; MANNING, 1978). O gene tem sido seqüenciado para mais de 100 espécies incluindo *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata* (DAMS *et al.*, 1988; HERNANDEZ *et al.*, 1990; LOOKER *et al.*, 1988). A comparação da seqüência publicada do gene em humanos (hospedeiros), artrópodes (vetores) e dos kinetoplastidas (parasitas) indica que somente em torno de 800 bases na parte central do gene mostram considerável heterologia (DAMS *et al.*, 1988).

Van Eys *et al.* (1992) analisaram a seqüência da parte variável da SSU rRNA de nove espécies de *Leishmania* e compararam com a do *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*. Em suas observações verificaram a existência de alguns pontos de mutações entre as espécies de *Leishmania* localizados em dois blocos de seqüências na parte central do gene SSU rRNA, que são específicos para Kinetoplastida. Na realização da PCR verificaram que a amplificação com os iniciadores R222 e R333, originados dos blocos, resultou em uma amplificação específica para o gênero *Leishmania*.

A técnica utilizada neste estudo é baseada no trabalho de Cruz *et al.* (2002), que desenvolveram o método *Leishmania nested* PCR (LnPCR). Os iniciadores utilizados foram previamente desenvolvidos (VAN EYS *et al.*, 1992), visando a região SSU rRNA. A LnPCR apresenta como vantagens alto grau de sensibilidade e especificidade, devido ao segundo conjunto de iniciadores, específicos para o gênero *Leishmania*, que amplificam os produtos de PCR obtidos na primeira reação. A finalidade da segunda amplificação é melhorar a sensibilidade e a especificidade da reação de PCR. Muitos pesquisadores têm usado a SSU rRNA como alvo para a PCR utilizando iniciadores específicos para a ordem Kinetoplastida, mas não exclusivamente para *Leishmania* (LACHAUD *et al.*, 2000; SPANAKOS *et al.*, 2002). Nestes casos para confirmar a infecção por *Leishmania* se torna necessária uma hibridização com sonda específica para *Leishmania*. O intuito de utilizar uma *nested* PCR com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* é evitar resultados falsos positivos devido à infecção causada por outros parasitas da ordem Kinetoplastida.

2.1.4) *Internal transcribed spacer 1 nested PCR (ITS1 nPCR)*

A técnica baseia-se na amplificação da região espaçadora interna transcritível 1 (ITS 1) entre os genes SSU rRNA e 5.8S rRNA. Esta região difere no tamanho e na seqüência nucleotídica entre as espécies de *Leishmania* (SCHÖNIAN *et al.*, 2003). Estudos anteriores mostraram que 0,9 a 1,2 kb da região espaçadora não codificante entre os genes SSU e LSU rRNA é altamente variável e que todas as espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo podem ser distinguidas pela digestão do espaçador amplificado com enzimas de restrição (CUPOLILLO *et al.*, 1995; SCHÖNIAN *et al.*, 2003). A seqüência do ITS1, que varia de 300 a 350 pb dependendo da espécie, foi escolhida como alvo para o método de PCR. Os iniciadores específicos para *Leishmania* que amplificam o ITS 1 foram desenhados por El Tai *et al.* (2000). Utilizaremos uma variação *nested* da metodologia em que o material obtido na primeira amplificação será reamplificado. Os produtos de PCR obtidos na segunda amplificação serão processados pelo método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Esse é um método que detecta pequenas variações em um gene onde a substituição de uma única base pode permitir ou impedir a digestão por uma enzima de restrição. As endonucleases de restrição pertencem a uma classe de enzimas bacterianas que cortam ou digerem fitas duplas de DNA somente na ocorrência de seqüências específicas de quatro ou mais bases (SINGH, 1997). Esse método possibilita a diferenciação de espécies de *Leishmania* após a digestão dos produtos amplificados com a enzima de restrição *HaeIII* e posterior eletroforese.

As técnicas serão comparadas inicialmente utilizando-se DNA isolado de promastigotas cultivados de *L.(L.) chagasi* e *L.(V.) braziliensis*, e em seguida utilizando amostras clínicas, obtidas pelo método do *swab* conjuntival, de cães sintomáticos e soropositivos.

3) JUSTIFICATIVA

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser difícil, pois os sinais clínicos são variáveis e muitos são parecidos com os de doenças causadas por outros agentes etiológicos (HARRIS *et al.*, 1998). Devido à freqüente ausência de sintomas clínicos nos cães e à dificuldade da detecção direta do parasita, o diagnóstico rápido e indireto da infecção canina tem se transformado em parte essencial dos programas de controle (BADARÓ *et al.*, 1987). A caracterização da *Leishmania* spp. é importante em estudos epidemiológicos e na aplicação das medidas de controle, visto que podem ser necessários tratamentos ou métodos de controle específicos (MARFURT *et al.*, 2003; VOLPINI *et al.*, 2004). A sorologia tem demonstrado ser ineficiente na detecção da LVC em uma proporção bastante elevada (5 a 40%) dos casos com sinais clínicos (QUINELL *et al.*, 2001; REALE *et al.* 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). Muitos métodos de diagnóstico sorológicos freqüentemente utilizados nos programas de controle apresentam sensibilidades variando de 80% a 100% e especificidades variando de 80% a 98% (REED *et al.*, 1990).

Os métodos sorológicos partem do pressuposto que a maioria, ou todos os animais infectados desenvolvem uma resposta imunológica específica que pode ser detectada pelos métodos disponíveis. Entretanto, a proporção de soroconversão entre os animais com infecção clínica ou subclínica é incerto. Testes sorológicos podem identificar a exposição aos parasitas, mas não indicam uma infecção ativa. Nas áreas endêmicas do Brasil os cães são periodicamente analisados por sorologia, geralmente pelo ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta (DAT) e ensaio imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos e são limitados em termos de especificidade e reprodutibilidade (BADARÓ *et al.*, 1981; SUNDAR; RAI, 2002).

Níveis de sensibilidade e especificidade adequados são desejáveis para evitar resultados falsos negativos (que podem ocorrer em infecções recentes e animais imunossuprimidos), que permitiriam a transmissão da doença, e falsos positivos (por reação cruzada com *Trypanosoma cruzi*, *L. braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis*) que levariam a eutanasia de cães não infectados (BARBOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 2007; HARITH *et al.*, 1987).

Nestes últimos anos muitos pesquisadores vêm se empenhando no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra as leishmanioses. A efetiva vacinação contra LVC pode prevenir a doença em cães e constitui uma importante estratégia para diminuir a transmissão da infecção para humanos. Após 25 anos de pesquisa foi licenciada e industrializada no Brasil uma vacina

contra a LVC, que tem demonstrado gerar níveis de proteção de 92 a 95% em cães vacinados (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Porém o grande inconveniente é que o cão vacinado pode apresentar reação positiva nos testes sorológicos convencionais, por não serem capazes de distinguir os anticorpos induzidos pela vacina dos naturalmente produzidos devido à infecção. O monitoramento dos animais vacinados se transformou em um problema, pois os testes sorológicos regularmente utilizados para o diagnóstico podem ser ineficazes para diagnosticar a infecção contraída durante ou após o período de vacinação.

Uma alternativa atraente neste cenário é a técnica de PCR que permite a detecção de DNA do parasita. Como os animais vacinados e não infectados não apresentam reação positiva na reação de PCR esta se apresenta como uma solução para o monitoramento dos cães vacinados. O ensaio qualitativo de PCR é útil quando há necessidade de se obter o diagnóstico rápido, especialmente nos casos em que os resultados sorológicos sejam duvidosos (VITALE *et al.*, 2004). A PCR também tem se mostrado útil na detecção de *Leishmania* em cães assintomáticos e soronegativos (BERRAHAL *et al.* 1996; REALE *et al.* 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). A técnica é suficientemente sensível, específica e rápida para atender as necessidades dos programas de controle.

Uma variedade de tecidos tem sido utilizada na PCR para diagnosticar a LVC. Entretanto a maioria das amostras é obtida de maneira invasiva, tornando muitas vezes inviável a realização do exame em cães devido à resistência dos proprietários. Isso levou alguns pesquisadores a estudar métodos não invasivos de coleta de amostras. Uma das alternativas de escolha tem sido a coleta de sangue, pois o sangue periférico tem mostrado ser quase sempre PCR positivo para LV em humanos (LACHAUD *et al.*, 2000) e parasitas circulantes já foram verificados em cães (REALE *et al.*, 1999; REITHINGER *et al.*, 2000). Esse tipo de amostragem é pouco invasivo e fácil quando comparado com aspirado de linfonodo ou medula óssea. Embora alguns estudos tenham mostrado que a PCR com amostras de sangue apresenta boa sensibilidade (MANNA *et al.*, 2004), outros mostraram que o sangue de cão é uma fonte ruim para obtenção de DNA de *Leishmania* (REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001) devido à presença de inibidores da reação de PCR (LACHAUD *et al.*, 2002) e a positividade inconsistente durante a infecção (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004), pois a quantidade de parasitas tende a diminuir no decorrer da infecção.

Outra alternativa de coleta, que tem rendido bons resultados e apresenta como grande vantagem não ser invasiva, é a realizada pelo método do *swab* conjuntival. Estudos têm mostrado que anormalidades oculares são observadas em mais de 54% dos cães com LVC

(KOUTINAS *et al.*, 2001) e que amostras obtidas das conjuntivas são boa fonte para obtenção de DNA de *Leishmania* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). Segundo Strauss-Ayali *et al.* (2004) e Ferreira *et al.* (2008) o uso das amostras obtidas de ambas oculares aumentou a sensibilidade do método, sendo fortemente recomendada. Também foi demonstrado no estudo de Strauss-Ayali *et al.* (2004) que a PCR de amostras conjuntivais obtidas por *swab* mostrou ser mais sensível que a cultura do parasita ou que a PCR de tecidos obtidos por métodos invasivos. Observaram também que cães experimentalmente infectados tornam-se positivos por PCR nas amostras de *swab* conjuntival antes da soroconversão. Estes dados enfatizam o potencial deste método de amostragem para diagnóstico da LVC, principalmente quando testes sorológicos são de pouca utilidade, como nos casos de cães submetidos à vacinação.

Muitos trabalhos já demonstraram a aplicabilidade da PCR para o diagnóstico da leishmaniose canina indicando ser esta uma técnica mais sensível e específica que os métodos tradicionais (ASHFORD *et al.*, 1995; MANNA *et al.*, 2004; REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). Um dos maiores obstáculos para a implementação desta técnica é a falta de padronização. Desde 1989 mais de 400 publicações foram realizadas sobre o diagnóstico da leishmaniose por PCR, utilizando-se diferentes genes alvos, protocolos e amostras. No entanto pouquíssimos trabalhos foram realizados até o momento com objetivo de comparar a eficiência das diversas técnicas de PCR disponíveis (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; LACHAUD *et al.*, 2002; MEREDITH *et al.*, 1993; RAMIREZ *et al.*, 2000; REITHINGER *et al.*, 2000; WEIGLE *et al.*, 1991).

Lachaud *et al.* (2002) realizaram um estudo comparando seis métodos de PCR utilizando amostras de sangue periférico de cães para detectar LVC. Entre os métodos de PCR foram comparados três métodos utilizando iniciadores endereçados para o DNA genômico e os outros três endereçados para o kDNA. Foram avaliados em cada método a sensibilidade, a especificidade, a reprodutibilidade e a facilidade de interpretação. Os métodos foram primeiramente testados utilizando-se amostras de cultura de promastigotas. Todos foram capazes de detectar menos de um parasita por tubo. Posteriormente foram analisadas amostras de 37 cães de áreas endêmicas e agrupados de acordo com o status clínico e a sorologia específica. Dos métodos testados somente quatro foram suficientemente confiáveis para diagnosticar a LVC. Em seu resultado concluiu que dois métodos tendo como alvo o kDNA puderam detectar os parasitas em 100% dos cães infectados e sintomáticos. Todos os cães

foram PCR positivos para esses métodos contra 62% dos métodos que apresentavam como alvo o DNA genômico. Os métodos que utilizaram os iniciadores endereçados para o kDNA demonstraram ser superiores aos outros métodos na detecção de *Leishmania* em cães assintomáticos.

Schönian *et al.* (2003) avaliaram a sensibilidade e especificidade de dois métodos de PCR, sendo que um amplifica a região variável do gene SSU rRNA e o outro a ITS1. Foram analisadas amostras de sangue, aspirados de medula óssea, biópsia de pele e esfregaço de pele sobre papel filtro ou sobre lâminas de vidro. Foram utilizadas amostras de cães e humanos. Também foi realizada uma diluição seriada de cultura de promastigotas de *L. donovani* ou *L. infantum*. O método SSU rRNA – PCR foi mais sensível do que o ITS1-PCR. Quando foi realizada uma *nested* no método ITS1 PCR a sensibilidade do método se igualou a do SSU rRNA PCR. A digestão dos produtos do ITS1 PCR pela enzima de restrição *HaeIII*, permitiu a distinção de espécies de *Leishmania* que parasitam o homem.

Meredith *et al.* (1993), desenvolveram métodos de PCR baseados no SSU rRNA e nas seqüências de kDNA para detecção e caracterização de parasitas de *Leishmania*. Foram utilizadas amostras de material de biópsias, sangue, impressões nasais sobre papel de nitrocelulose e amostras de sangue coletadas em papel filtro. A especificidade e a sensibilidade dos vários conjuntos de iniciadores e condições de amplificação foram estabelecidas utilizando-se diluições de DNA purificado e/ou diluições de cultura de promastigotas. As PCRs desenvolvidas neste estudo mostraram ser sensíveis para detecção e identificação de *Leishmania* em vetores e hospedeiros mamíferos.

Bensoussan *et al.* (2006), comparou três métodos de PCR para diagnosticar Leishmaniose cutânea (LC) utilizando amostras coletadas de nódulos ou das bordas de úlceras. Esses métodos também foram comparados com cultura de promastigotas e microscopia para validar as técnicas de PCR para diagnóstico molecular de LC. Dos métodos de PCR utilizados o kDNA PCR apresentou maior sensibilidade seguido pelo ITS 1 PCR. O método mini-exon PCR demonstrou ser pouco sensível, até mesmo quando comparado com a cultura de promastigotas e a microscopia.

Nasereddin *et al.* (2006), em seu trabalho avaliou a sensibilidade e a especificidade dos métodos de kDNA-PCR, ITS1 PCR, mITS1 PCR e ELISA utilizando amostras de sangue de cães. Os resultados mostraram que o método kDNA PCR foi o mais sensível, seguido pelo mITS1 PCR, ELISA e ITS1 PCR. Com a digestão dos produtos dos métodos mITS1 PCR e

ITS1 PCR verificaram que todos os cães positivos para esses métodos estavam infectados por *L. infantum*.

Nosso objetivo neste trabalho foi realizar um estudo comparativo entre metodologias de PCR usualmente utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose, previamente testadas em estudos clínicos e de campo, utilizando amostras obtidas pelo procedimento do *swab* conjuntival e a partir dos resultados obtidos indicar o método mais adequado para o diagnóstico da LVC.

4) OBJETIVOS

4.1) Objetivo Geral

Comparar diferentes métodos de PCR para o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina utilizando amostras coletadas pelo método do *swab* conjuntival.

4.2) Objetivos específicos

Comparar a sensibilidade dos diferentes métodos de PCR utilizando diluições seriadas de DNA isolado de promastigotas cultivados de *L.(L.) chagasi* e *L.(V.) braziliensis*.

Comparar a sensibilidade dos diferentes métodos de PCR em amostras clínicas de cães soropositivos, obtidas pelo método do *swab* conjuntival, utilizando-se o método de fenol-clorofórmio para extração de DNA dos *swabs*.

Comparar a sensibilidade dos diferentes métodos de PCR em amostras clínicas de cães soropositivos, obtidas pelo método do *swab* conjuntival, utilizando-se o método de fervura para extração de DNA dos *swabs*.

Identificar por RFLP as espécies de *Leishmania* responsáveis pela infecção nos cães analisados a partir dos produtos de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR.

Indicar, com base nos resultados obtidos, o método mais adequado para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina por PCR a partir de amostras obtidas pelo método *swab* conjuntival.

5) MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (n° de protocolo 198/2006).

5.1) Diluição seriada de DNA de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Promastigotas de *L.(L.) chagasi* (cepa MHOM/1973/BH46) e de *L.(V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903) foram cultivadas em meio BHI, suplementado com 10% de soro fetal bovino e coletados em fase logarítmica no sexto dia de cultivo. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sedimento formado foi lavado e centrifugado por três vezes utilizando PBS (pH 7,2). O DNA dos parasitas foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio. A quantidade de DNA obtida foi estimada através da absorvância a 260 nm e a qualidade da extração pela razão das absorvâncias de 260 nm/280 nm, sendo o valor resultante maior que 1,6 indicando um bom nível de pureza. A concentração da solução foi ajustada para 0,5 µg/µL. A partir dessa concentração foram realizadas diluições para obter as concentrações de análise de 10 ng/µL, 1 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL, 100 fg/µL, 10 fg/µL e 1 fg/µL.

5.2) Cães

A sensibilidade dos diferentes métodos de PCR para detecção de *Leishmania* também foi avaliada em amostras obtidas de cães soropositivos através da técnica do *swab* conjuntival.

Foram utilizados 46 cães sintomáticos e soropositivos para as reações de ELISA, RIFI e fixação de complemento. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos. No grupo 1 o DNA das amostras foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e no grupo 2 por fervurva.

Os cães foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, Minas Gerais, oriundos dos levantamentos rotineiros locais.

5.3) Coleta de amostras

Foram coletadas células exfoliativas da conjuntiva inferior de ambas as oculares dos animais. Para a coleta foram utilizados *swabs* estéreis manufacturados para isolamento de bactérias (FIG. 3).



Figura 3: Coleta de amostra pelo método do *swab* conjuntival.
Fonte: FERREIRA *et al.*, 2008.

Depois de realizado o esfregaço, as extremidades dos *swabs* foram cortadas e acondicionadas em tubos *ependorf* estéreis de 1,5 mL, sendo esses armazenados a -20°C até o uso.

5.4) Extração de DNA por fenol-clorofórmio

Este método de extração foi baseado no trabalho Strauss-Ayali *et al.* (2004) com modificações.

Foi adicionada ao material a ser analisado uma mistura de 300 µL de proteinase K (250 µg/mL) e Triton X-100 (1%) em tampão de lise (50 mM Tris, 50 mM NaCl e 10 mM EDTA [pH 8,0]), sendo incubado a 56°C por 2 h. A solução foi eluída do material e a remoção dos contaminantes foi realizada mediante três lavagens com 500 µL de fenol e clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) em tubos *Phase Lock Gel Heavy*. Na primeira lavagem foi utilizado 75% de fenol, na segunda 50% e na última 100% de clorofórmio – álcool isoamílico. Após cada lavagem, as soluções foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Em seguida, 50 µL de acetato de sódio 3M foram adicionados em cada amostra. O DNA foi precipitado usando-se um volume de isopropanol e, logo em seguida, foi lavado com 250 µL de etanol 75%. Após centrifugação, foi adicionado ao DNA 30 µL de TE (10 mM Tris e 1mM EDTA [pH 8,0]), sendo armazenado a -20°C até ser usado.

5.5) Extração de DNA por fervura

As extremidades dos *swabs* utilizados no esfregaço foram colocadas em tubos *ependorf* de 1,5 mL onde receberam 300 µL de água deionizada autoclavada. O material foi fervido em bloco seco por 15 minutos e posteriormente centrifugado a 14.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos *ependorf* estéreis, sendo esses deixados a -20°C até o momento de uso.

5.6) MÉTODOS DE PCR

Em todos os métodos de PCR descritos a seguir foi utilizado como controle positivo 1,0 µL de DNA genômico de *L. (L.) chagasi* da cepa MHOM/1973/BH46 na concentração de 1,0 ηg/µL. Nos controles negativos o DNA foi substituído por água destilada estéril. Para todos os métodos foi utilizado o volume de amostra de 1,0 µL.

As diferentes etapas da reação de PCR foram realizadas em laboratórios diferentes para evitar a contaminação por *amplicons*.

5.6.1) kDNA PCR – Hibridização

5.6.1.1) PCR

Este método de PCR apresenta como alvo para amplificação a região conservada dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA) (DEGRAVE *et al.*, 1994). A reação de PCR foi realizada com os seguintes componentes: 1,0 µL da solução de cada amostra de DNA, 5,0 µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs – dATP, dCTP, dGTP, e dTTP) a 10 mM, 0,2 nmol de cada oligonucleotídeo iniciador [5'–(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC–3' e 5'GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA–3'], 5 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotec), 5,0 µL da solução tampão 10X (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 50 mM), 1,5 µL de MgCl₂ a 2,0 mM e um volume complementar de água deionizada autoclavada para completar o volume final de 50 µL. As amostras foram amplificadas em um termociclador (PT-100 BIO RAD) utilizando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguida por 30 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C e 30 s a 72°C, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Depois deste passo o sistema permaneceu a 4°C.

Após a amplificação, 20 µL dos produtos de PCR das amostras foram misturados a 5µL de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Foi utilizado como marcador de peso molecular fragmentos múltiplos de 100 pb. A corrida foi realizada em tampão TBE 1X, sendo aplicada uma diferença de potencial de 90 V.

Para visualizar o resultado o gel foi exposto à luz ultravioleta em um transluminador. A sequência alvo amplificada deve apresentar 120 pares de base (pb).

5.6.1.2) *Dot Blot* e Hibridização

Os outros 10 μL dos produtos de PCR foram utilizados para hibridização. Estes foram aquecidos a 100°C por 5 min e resfriados em gelo. Após resfriamento foram acrescentados 11 μL de solução desnaturante (NaOH 0,4 M, EDTA 25 mM [pH 8,0]). Em seguida, as amostras foram transferidas, sob vácuo, para membrana de nylon utilizando-se o sistema *Bio Dot (Hybri-dot manifold-BRL®)*. A estas amostras foram adicionados mais 100 μL da solução desnaturante e foram novamente submetidos ao vácuo. A membrana foi retirada do aparelho e lavada com uma solução de SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 0,3 mM). Após a lavagem foi deixada secar sobre papel filtro a temperatura ambiente. O DNA foi fixado à membrana após submetê-la à luz ultravioleta no aparelho *Stratalinker* aplicando uma energia de 0,12 J por centímetro quadrado.

As condições de hibridização foram previamente descritas por Andrade *et al.* (2001). Minicírculos clonados de *Leishmania (Leishmania) chagasi* foram utilizados como sondas. Estes foram marcados com ^{32}P [α]dCTP utilizando-se o método dos iniciadores aleatórios (Invitrogen®). A membrana de nylon, contendo as amostras, foi pré-incubada a 58°C por 30 min em solução de leite desnatado a 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e SSC 2X. A solução foi trocada utilizando-se um volume suficiente para cobrir a membrana. As sondas marcadas foram adicionadas após terem sido desnaturadas a 100°C por 3 min. As membranas foram incubadas por 14 horas a 58°C , com agitação, e depois lavadas em solução SSC 0,5 X, SDS a 0,5% a 65°C por 30 min. Após lavagem a membrana foi deixada secar a temperatura ambiente. Ao final, foi exposta ao cassete BAS 2325 (Fujifilm®) por 2 h. A imagem foi obtida através do analisador de imagem *Bio-Imaging Analyzer* (Fujifilm®).

5.6.2) kDNA semi *nested* PCR (kDNA snPCR)

Este método foi conduzido de acordo com Morales *et al.* (2002), sendo realizadas duas reações de PCR, tendo como alvo de amplificação a região variável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA). Por ser uma reação semi *nested* um dos oligonucleotídeos iniciadores é utilizado nas duas reações de PCR.

Na primeira etapa a reação de PCR foi realizada com 1,0 µL de solução de amostra de DNA, 5,0 µL de solução tampão 10X (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 50 mM), 2,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 1,0 µL de dNTPs a 10 mM, 1,4 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15pmol de solução de trabalho de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – CGA TTT TTG AAC GGG ATT TCT GCA C – 3' e 5' – CTC CGG GGC GGG AAA CTG G – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 50 µL.

Para a segunda reação de PCR 25 µL do produto de amplificação da primeira reação foram diluídos em 1 mL de água destilada e estéril, sendo que 10 µL desta solução foram utilizados como amostra de DNA. Foram adicionados à amostra de DNA, 2,5 µL de solução tampão 10X, 1,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,7 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15 pmol de solução de trabalho de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – CGA TTT TTG AAC GGG ATT TCT GCA C – 3' e 5' – GGG GTT GGT GTA AAA TAG GGC CGG – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 25 µL.

Nas duas etapas descritas acima as amostras foram amplificadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 30 s a 67°C e 30 s a 72°C e a extensão final a 72°C por 5 min. Depois disso o sistema permaneceu a 4°C. O termociclador (PT-100 BIO RAD) foi programado para delinear todas essas etapas nas temperaturas e tempos determinados.

A visualização dos produtos de amplificação de cada etapa foi realizada da mesma forma descrita para o método kDNA PCR-Hibridização utilizando-se um volume de 20 µL dos produtos de amplificação de PCR e 5 µL da solução de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v).

A sequência alvo deve apresentar aproximadamente 800 pb na primeira reação e 780pb na segunda reação.

5.6.3) *Leishmania nested* PCR (LnPCR)

Este método ocorre em duas etapas, sendo realizadas duas ampliações (*nested*), tendo como alvo de amplificação a região variável do gene codificante do RNA da subunidade ribossômica menor (SSU rRNA) (CRUZ *et al.*, 2002).

Na primeira etapa a reação de PCR foi realizada com 1,0 µL de solução de amostra de DNA, 5,0 µL de solução tampão 10X (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 50 mM), 2,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 1,0 µL de dNTPs a 10 mM, 1,4 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15pmol de solução de trabalho de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG – 3' e 5' – GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 50 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C e 30s a 72°C e a extensão final a 72°C por 5 min. Depois disso o sistema permaneceu a 4°C. O termociclador (PT-100 BIO RAD) foi programado para delinear todas essas etapas nas temperaturas e tempos determinados.

Para a segunda reação de PCR 25 µL do produto de amplificação da primeira reação foram diluídos em 1 mL de água destilada e estéril, sendo que 10 µL desta solução foram utilizados como amostra de DNA. Foram adicionados à amostra de DNA, 2,5 µL de solução tampão 10X, 1,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,7 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15 pmol de solução de trabalho de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – TCC CAT CGC AAC CTC GGT T – 3' e 5' – AAA GCG GGC GCG GTG CTG – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 25 µL. Nesta etapa da amplificação foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C e 30s a 72°C e a extensão final a 72°C por 5 min.

A visualização dos produtos de amplificação de cada etapa foi realizada da mesma forma descrita para o método kDNA PCR – Hibridização, utilizando-se um volume de 20 µL dos produtos de amplificação de PCR e 5 µL da solução de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v).

A sequência alvo da primeira reação deve apresentar 603 pb e a da segunda reação 353pb.

5.6.4) ITS1 *nested* PCR (ITS1 nPCR)

Neste método o alvo ITS 1, da região dos genes do RNA ribossômico, passa por duas ampliações (SCHÖNIAN *et al.*, 2003). Na primeira amplificação 1,0 µL de solução de amostra de DNA foi misturado a 5,0 µL de solução tampão 10X (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], KCl 50 mM), 2,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 1,0 µL de dNTPs a 10 mM, 1,4 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – CTG GAT CAT TTT CCG ATG – 3' e 5' – TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 50 µL.

Uma alíquota de 25 µL dos produtos de PCR da primeira amplificação foram diluídos em 1 mL de água destilada e estéril, sendo utilizados 10 µL dessa solução para amostra de DNA na segunda amplificação. Os demais constituintes da reação são: 2,5 µL de solução tampão 10X, 1,0 µL de MgCl₂ a 2 mM, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,7 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase, 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador [5' – CAT TTT CCG ATG ATT ACA CC – 3' e 5' – CGT TCT TCA ACG AAA TAG G – 3'] e um volume complementar de água deionizada autoclavada totalizando um volume final de 25 µL.

Nas duas etapas descritas acima as amostras foram amplificadas em um termociclador (PT-100 BIO RAD) utilizando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C e 30 s a 72°C, e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min.

A visualização dos produtos de amplificação de cada etapa foi realizada da mesma forma descrita para o método kDNA PCR - Hibridização, mas utilizando um volume de 20 µL dos produtos de amplificação de PCR e 5 µL da solução de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v).

O produto de PCR para a primeira reação deve apresentar de 300 a 350 pb, já o da segunda reação de 280 a 330 pb.

5.6.4.1) *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Esta técnica permite a identificação das espécies de *Leishmania*. Para tal, 17 µL dos produtos de amplificação da segunda reação do método ITS1 nPCR foram misturados a 10 unidades da enzima de restrição *HaeIII* e a 2 µL do tampão da enzima (10 mM Tris-HCL,

50mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTE [pH 7,5]). Esta mistura foi incubada por 3 horas a 37°C. O padrão de bandas produzido pela digestão com a *HaeIII* foi visualizado por eletroforese em gel de agarose. Neste caso especificamente, foi utilizada uma agarose de alta resolução (SIGMA ALDRICH), que permite uma melhor visualização das bandas formadas. Para realização da corrida foram utilizados 20 µL dos produtos de digestão com a *HaeIII* e 5µL da solução de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v). Além do controle de *L.(L.) chagasi* foi utilizado um controle de *L.(V.) braziliensis*.

5.7) Análise estatística

Para análise estatística o Teste Exato de Fisher foi utilizado na avaliação da positividade dos cães e o teste Qui quadrado (χ^2) na avaliação da positividade das amostras oculares, ambos com nível de significância de 5%. Este procedimento foi aplicado separadamente nos grupos 1 e 2. Dentro de cada grupo, os diferentes tratamentos foram confrontados dois a dois. Assim, foi verificado se houve ou não diferença significativa entre os resultados obtidos nos tratamentos utilizados.

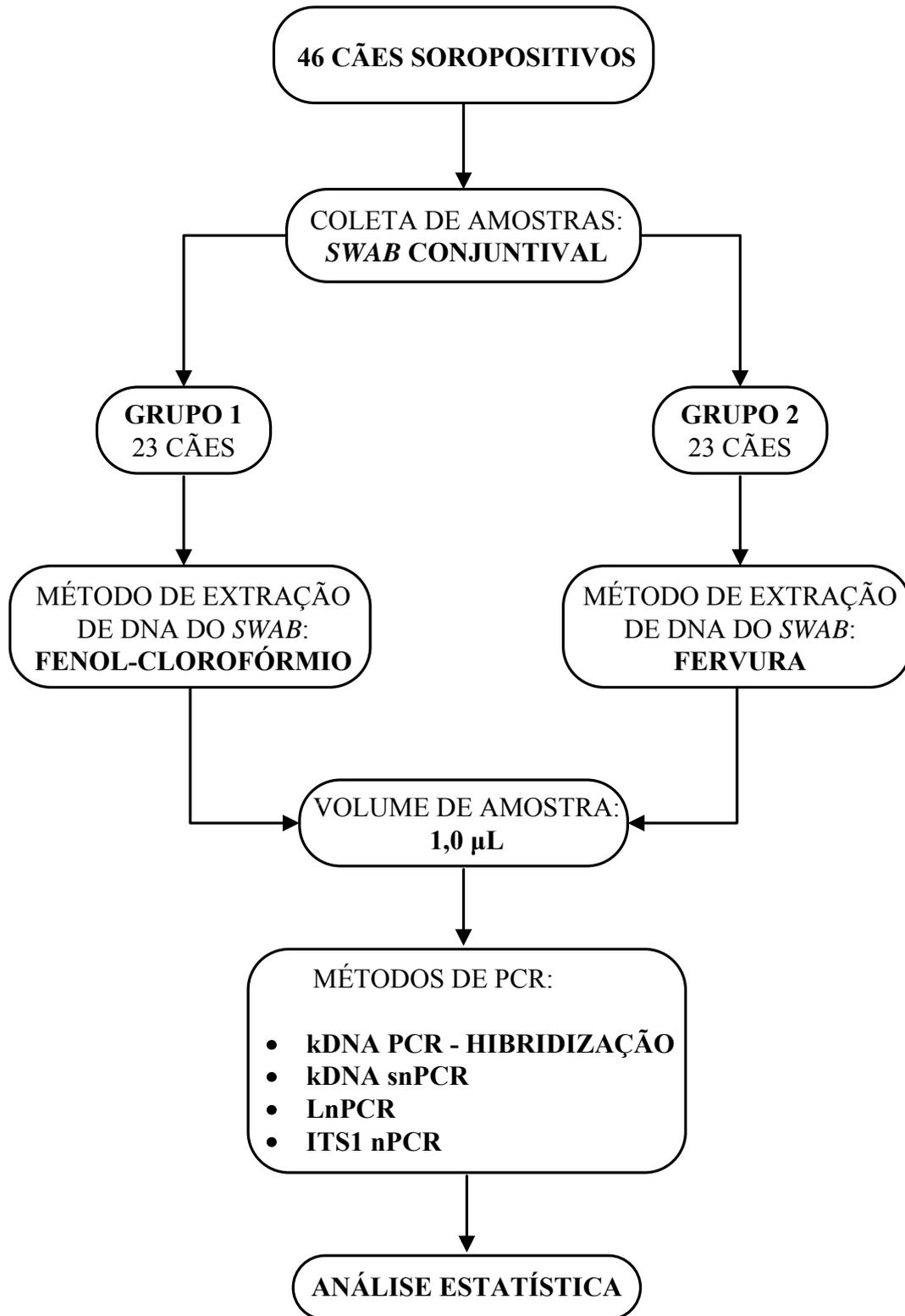


Figura 4: Organograma do processo de análise das amostras coletadas das conjuntivas dos cães pelo procedimento do *swab* conjuntival para diagnóstico da leishmaniose pelos métodos de PCR.

6) RESULTADOS

6.1) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

A sensibilidade dos quatro métodos de PCR foi primeiramente avaliada utilizando-se uma diluição seriada de DNA de promastigotas cultivados de *L. (L.) chagasi*. Os resultados estão expressos na TAB. 1.

Neste experimento foram analisadas quantidades de DNA de 10 ng até 1 fg. Todos os métodos testados possuem duas etapas: duas amplificações ou uma amplificação seguida de hibridização. Na primeira etapa verificamos que os métodos que utilizam como alvo os minicírculos de kDNA obtiveram melhores resultados. O kDNA PCR-Hibridização conseguiu detectar até 1 pg de DNA (FIG. 5A), enquanto método de kDNA snPCR, que amplifica a região variável dos minicírculos, detectou até 10 pg (FIG. 6A). Os outros métodos conseguiram detectar apenas até 100 pg (FIG. 7A e 8A). A segunda etapa, como esperado permitiu um aumento na sensibilidade, o método kDNA snPCR apresentou melhor resultado detectando até 10 fg (FIG. 6B) e os demais métodos detectaram até 100 fg (FIG. 5B, 7B e 8B). A hibridização aumentou em 10 vezes a sensibilidade do kDNA PCR-Hibridização e a segunda amplificação em 1000 vezes a sensibilidade dos métodos *nested* ou *semi nested*.

Segundo Vitale *et al.* (2004) 100 fg corresponde ao DNA de uma única célula de *Leishmania*, portanto o kDNA snPCR detecta até 0,1 parasita por tubo de reação e os outros métodos até 1,0 parasita.

Tabela 1: Sensibilidade dos métodos utilizando-se uma diluição seriada de DNA de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Método	Etapa	Quantidade de DNA de <i>L. (L.) chagasi</i>							
		10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg
kDNA PCR - Hibridização	PCR	+	+	+	+	+	-	-	-
	Hibridização	+	+	+	+	+	+	-	-
kDNA snPCR	1ª reação	+	+	+	+	-	-	-	-
	2ª reação	+	+	+	+	+	+	+	-
LnPCR	1ª reação	+	+	+	-	-	-	-	-
	2ª reação	+	+	+	+	+	+	-	-
ITS1 nPCR	1ª reação	+	+	+	-	-	-	-	-
	2ª reação	+	+	+	+	+	+	-	-

+ : Resultado Positivo

- : Resultado Negativo

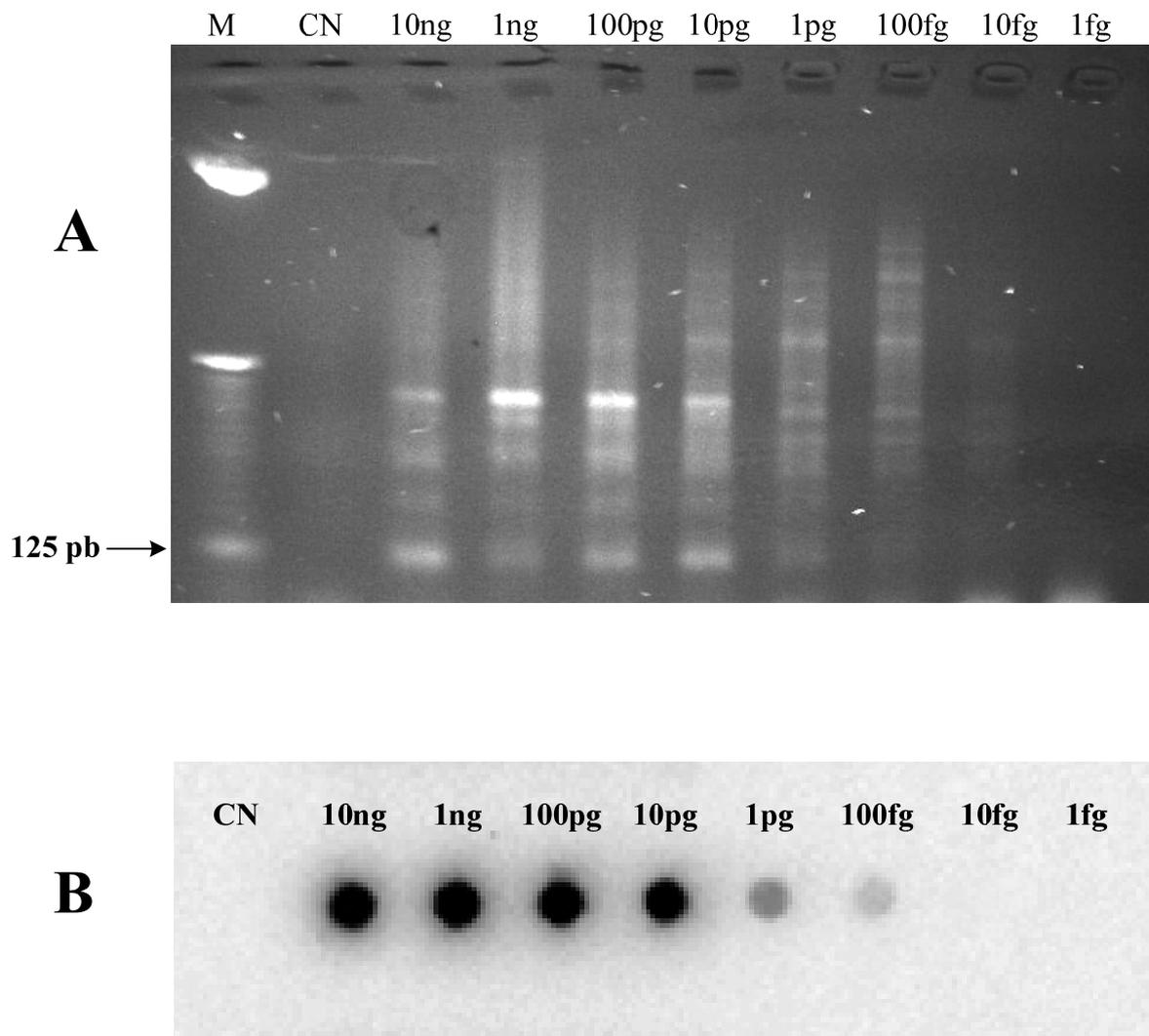


Figura 5: Resultados obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização a partir de DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Foram utilizados de 10 ng até 1fg de DNA. **A** - Gel de agarose 2% de produtos de PCR, produto amplificado apresenta 120 pb. **B** - *Dot blot* com produtos do PCR obtidos na 1ª etapa. Os produtos de PCR foram hibridizados com sondas de minicírculos clonados de kDNA de *L. (L.) chagasi* marcadas com ^{32}P . **M:** padrão de peso molecular - 25pb. **CN:** controle negativo sem DNA.

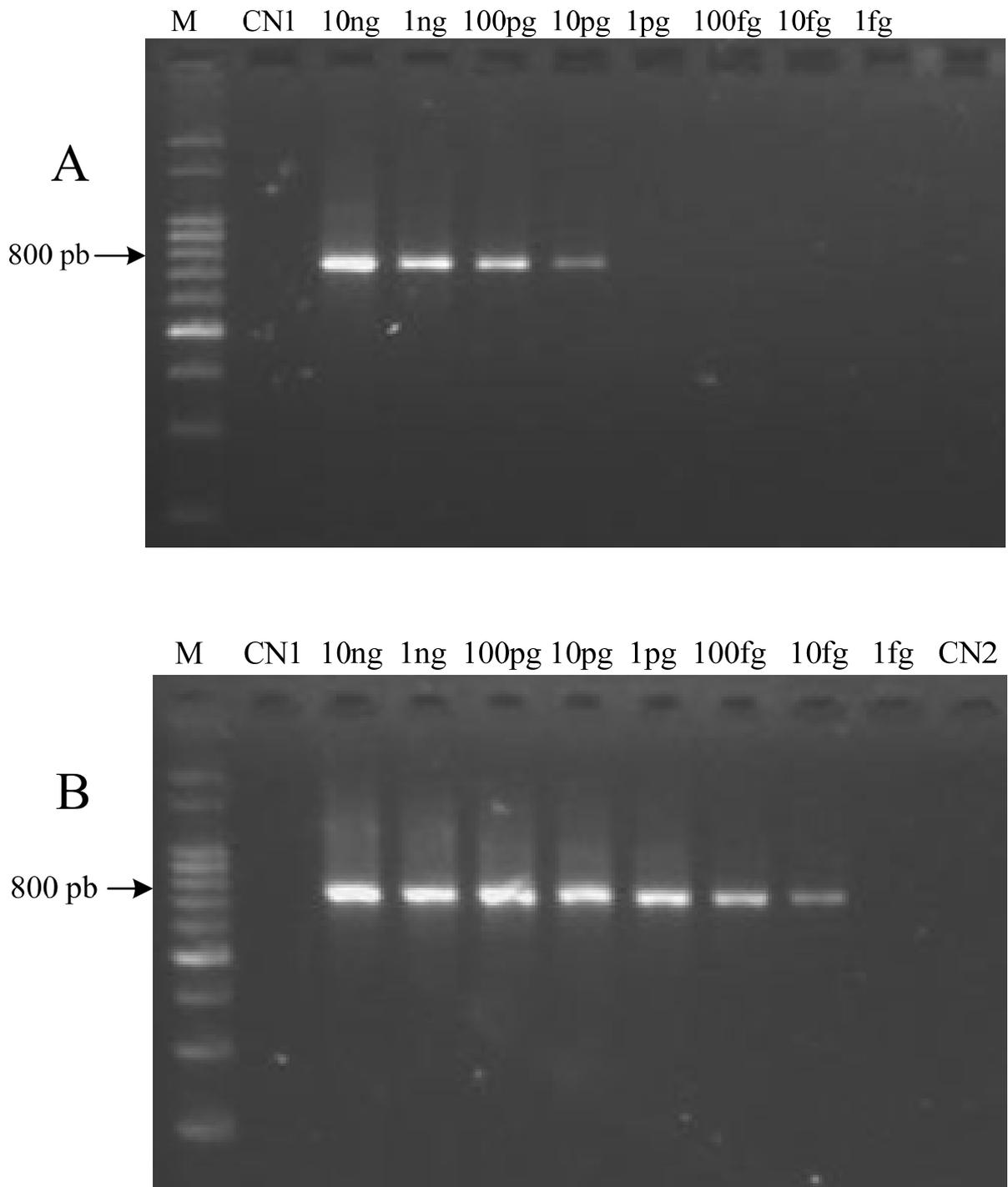


Figura 6: Géis de agarose 2% dos produtos de kDNA snPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Foram utilizados de 10 ng até 1fg de DNA. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação, produto amplificado apresenta 800 pb. **B** – Gel da agarose 2% dos produtos da 2ª reação, produto amplificado apresenta 780 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

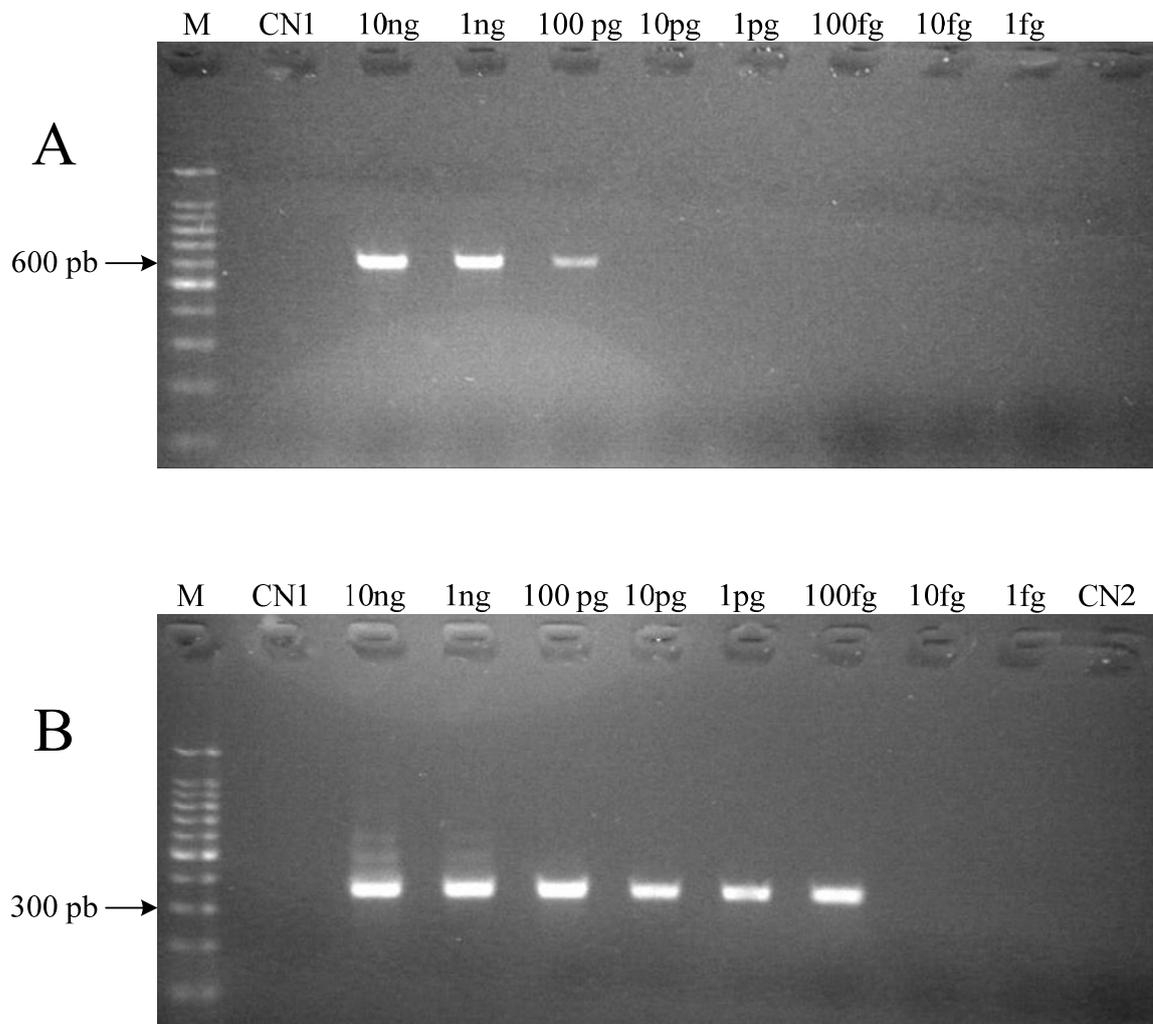


Figura 7: Géis de agarose 2% dos produtos de LnPcr para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Foram utilizados de 10 ng até 1fg de DNA. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação, produto amplificado apresenta 603 pb. **B** – Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação, produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

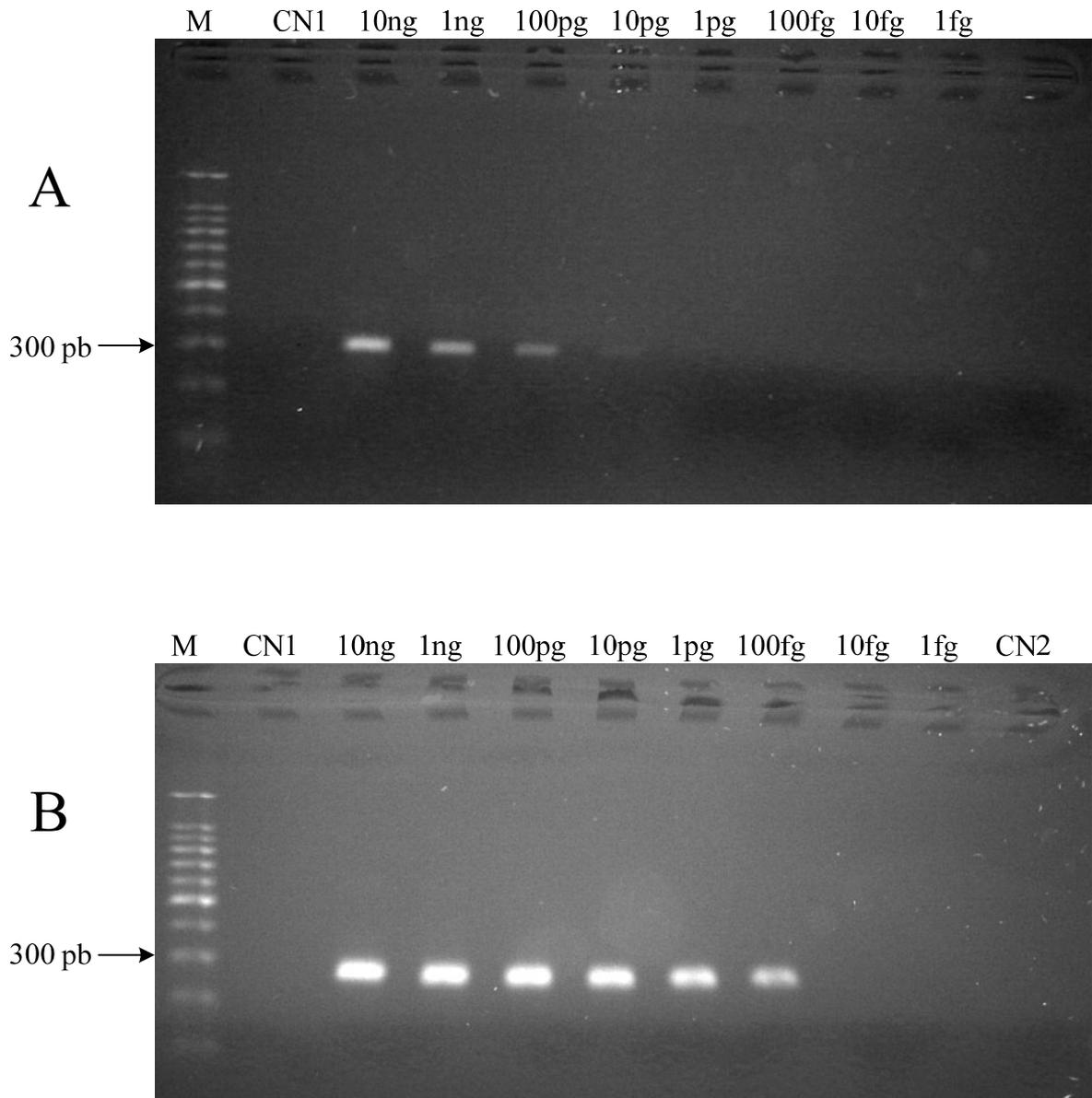


Figura 8: Géis de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Foram utilizados de 10 ng até 1fg de DNA. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação, produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **B** – Gel de agarose dos produtos da 2ª reação, produto amplificado apresenta 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

6.2) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Foi avaliada também a sensibilidade dos quatro métodos de PCR utilizando-se uma diluição seriada de DNA de promastigotas cultivados de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados observados estão representados na TAB. 2.

Neste experimento foram analisadas quantidades de DNA de 10 ng até 1fg. Na primeira etapa de cada método verificamos que o método mais sensível foi o kDNA PCR-Hibridização, por conseguir detectar até de 1 pg de DNA (FIG.9A), enquanto que os métodos LnPCR e ITS1 nPCR conseguiram detectar apenas 100 pg (FIG. 11A e 12A). Estes métodos apresentaram o mesmo desempenho obtido na primeira etapa da diluição seriada de DNA de *L. (L.) chagasi*. Na segunda etapa foi observado que o método ITS1 nPCR apresentou melhor resultado detectando até 10 fg, que corresponde a 0,1 parasita (FIG. 12B). O kDNA PCR-Hibridização e o LnPCR detectaram até 100 fg (FIG. 9B e 11B), correspondendo a 1,0 parasita. O método kDNA snPCR mostrou não ser adequado para a amplificação do DNA de *L. (V.) braziliensis*, pois não ocorreu amplificação em nenhuma das etapas (FIG 10A e 10B).

Aqui o aumento na sensibilidade proporcionado pela hibridização também foi de 10 vezes em relação à PCR. A segunda amplificação da LnPCR permitiu um aumento de 1000 vezes e no ITS1 nPCR o aumento foi de 10.000 vezes (TAB. 2).

Tabela 2: Sensibilidade dos métodos utilizando-se uma diluição seriada de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Método	Etapa	Quantidade de DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i>							
		10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg
kDNA PCR - Hibridização	PCR	+	+	+	+	+	-	-	-
	Hibridização	+	+	+	+	+	+	-	-
kDNA snPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-
	2ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-
LnPCR	1ª reação	+	+	+	-	-	-	-	-
	2ª reação	+	+	+	+	+	+	-	-
ITS1 nPCR	1ª reação	+	+	+	-	-	-	-	-
	2ª reação	+	+	+	+	+	+	+	-

+ : Resultado Positivo

- : Resultado Negativo

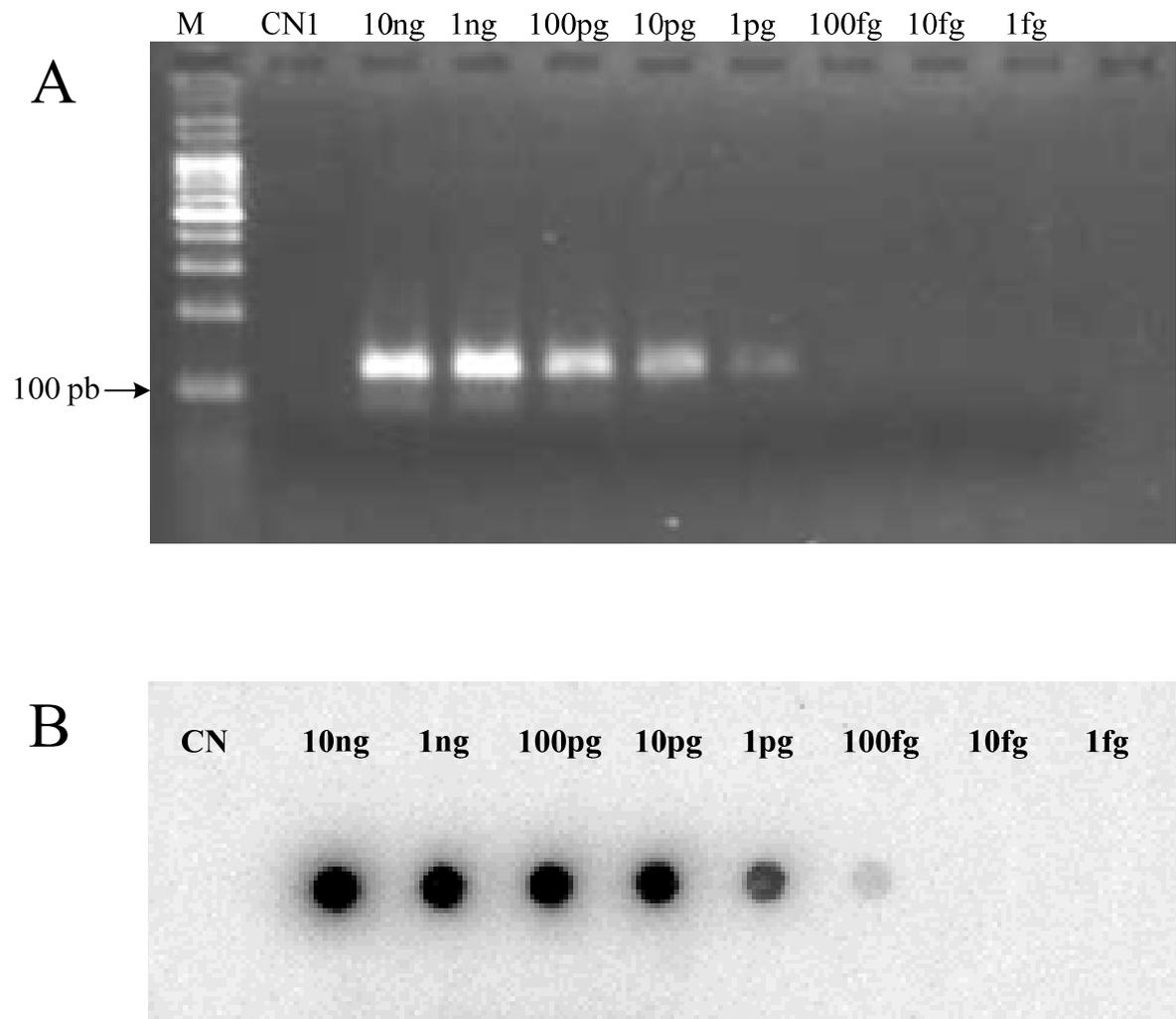


Figura 9: Resultados obtidos pelo método kDNA PCR - Hibridização a partir de DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Foram utilizados de 10 ng até 1fg de DNA. **A** - Gel de agarose 2% de produtos de PCR, produto amplificado apresenta 120 pb. **B** - *Dot blot* com produtos do PCR obtidos na 1ª etapa. Os produtos de PCR foram hibridizados com sondas de minicírculos clonados de kDNA de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com ^{32}P . **M:** padrão de peso molecular - 100 pb. **CN1** e **CN:** controle negativo sem DNA.

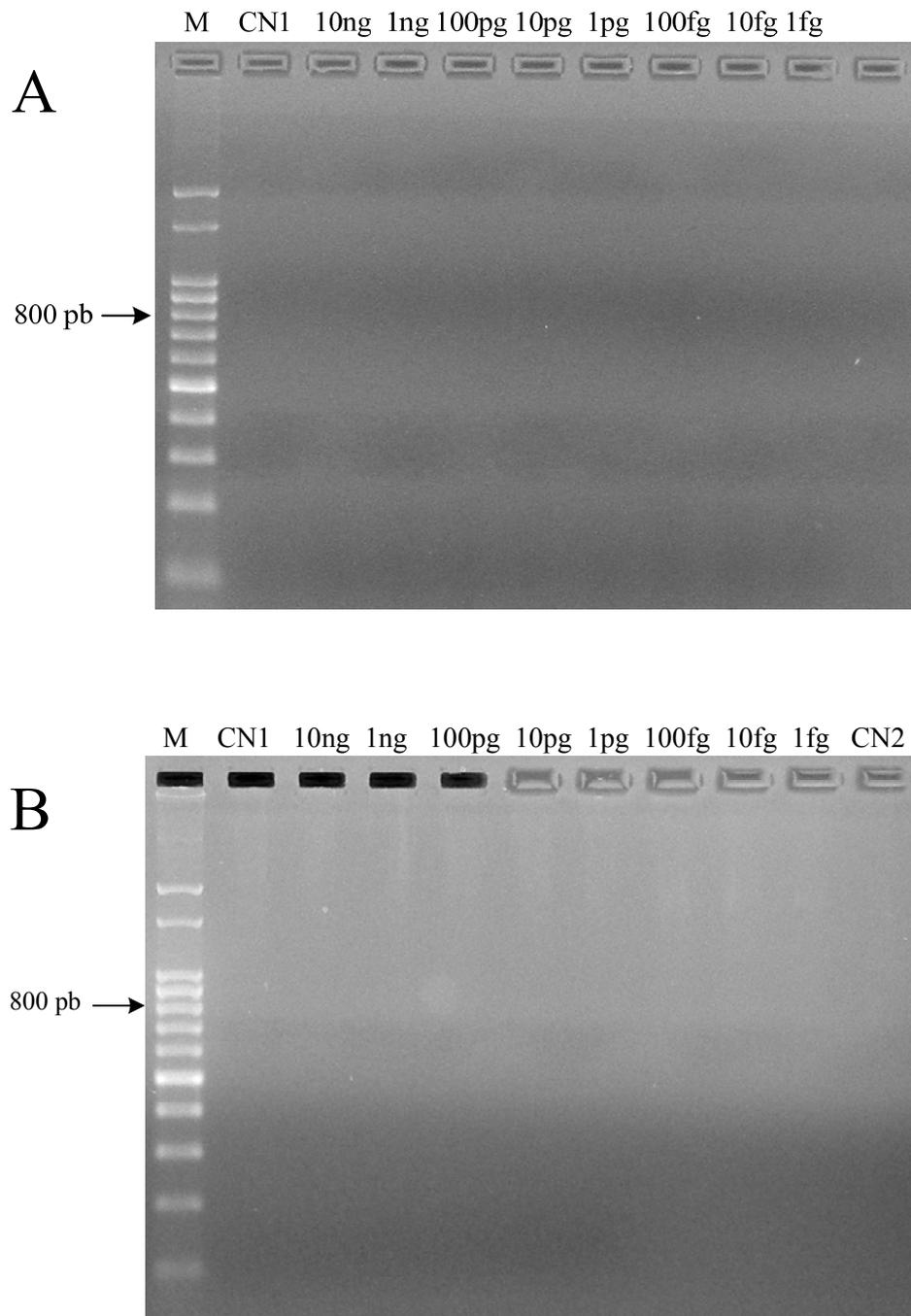


Figura 10: Géis de agarose 2% de kDNA snPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Foram utilizadas as concentrações de 10 ng até 1fg. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos de kDNA snPCR da 1ª reação. **B** – Gel de agarose 2% dos produtos de kDNA snPCR da 2ª reação. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

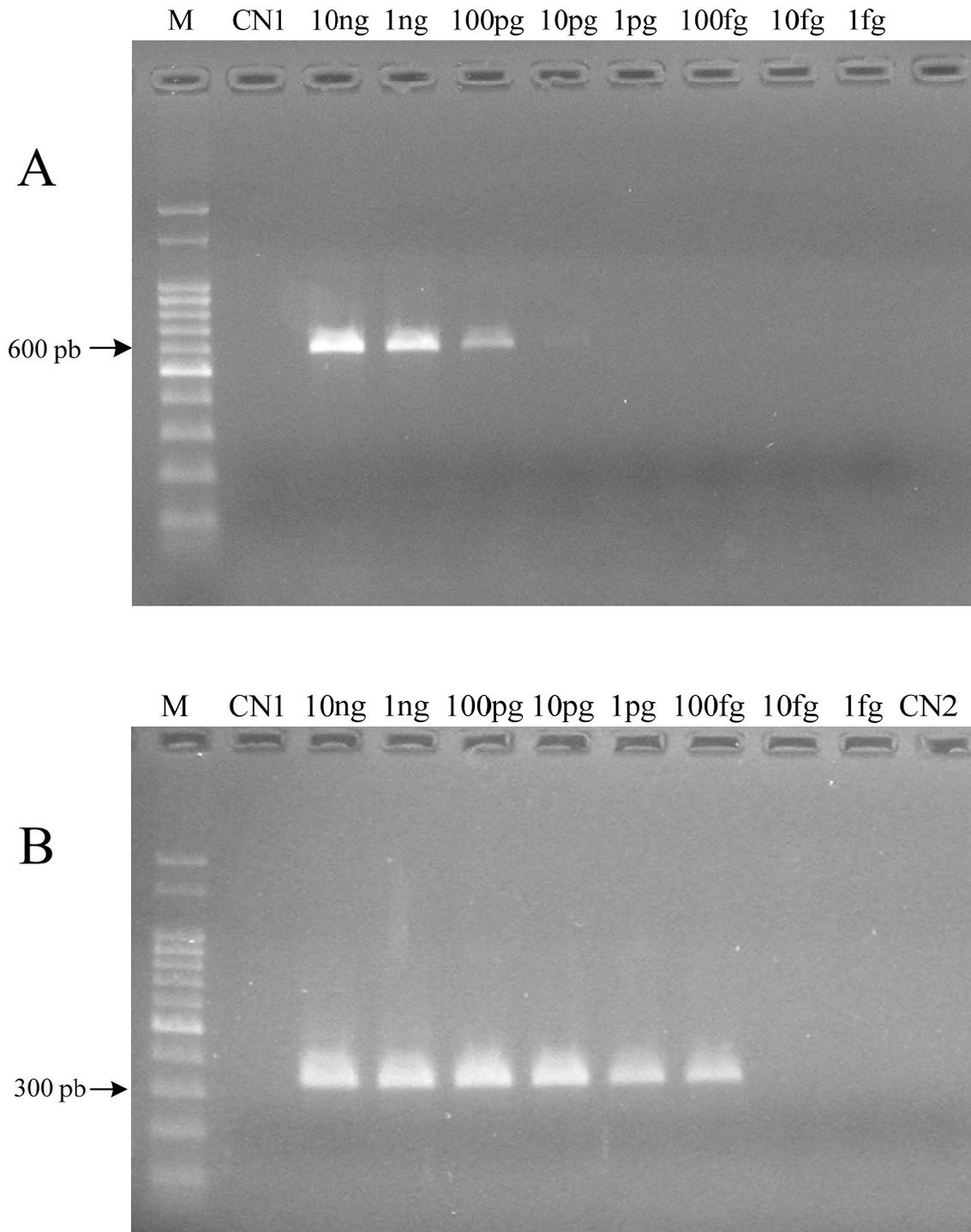


Figura 11: Géis de agarose 2% dos produtos de LnPcr para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Foram utilizados 10 ng até 1fg de DNA. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos de LnPcr da 1ª reação, produto amplificado apresenta 603 pb. **B** – Gel de agarose 2% dos produtos de LnPcr da 2ª reação, produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

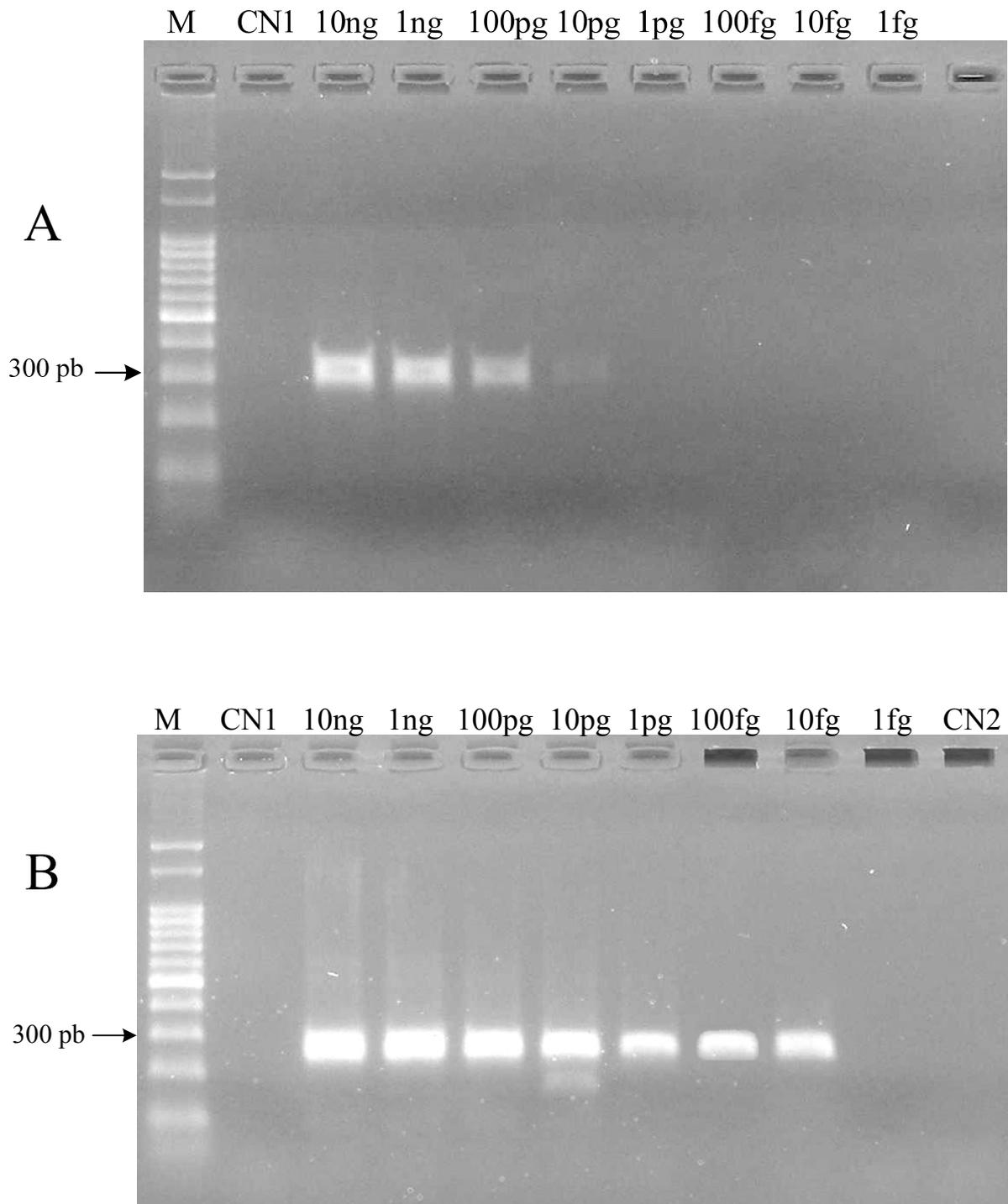


Figura 12: Géis de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR para DNA purificado de promastigotas cultivados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Foram utilizados 10 ng até 1fg de DNA. **A** – Gel de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR da 1ª reação, produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **B** – Gel de agarose 2% dos produtos de ITS1 nPCR da 2ª reação, produto amplificado apresenta de 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA da 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA da 2ª reação.

6.3) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se o DNA de amostras clínicas, obtidas pelo método do *swab* conjuntival, e extraído pelo método de fenol-clorofórmio (GRUPO 1)

Nas amostras clínicas coletadas das conjuntivas dos 23 cães do grupo 1 o DNA foi extraído do *swab* pelo método de fenol-clorofórmio.

Na primeira etapa o método que apresentou melhor desempenho foi o kDNA PCR-Hibridização, que detectou 16 cães positivos correspondendo a 69,6% do total de cães e 27 amostras positivas (considerando as oculares esquerda e direita) correspondendo a 58,7% do total de amostras (FIG. 13 e 14). Em seguida aparece o método kDNA snPCR (FIG. 16 e 18) com 11 cães positivos (47,8%) e 19 amostras positivas (41,3%). Os métodos LnPCR (FIG. 20 e 22) e ITS1 nPCR (FIG. 24 e 26) alcançaram o mesmo índice com 7 cães positivos (30,4%) e 13 amostras positivas (28,3%).

A segunda etapa permitiu um aumento da sensibilidade de todos os métodos. Os métodos que utilizaram como alvo o kDNA demonstraram melhores resultados. A Hibridização detectou 22 cães positivos (95,6%) e 40 amostras positivas (86,9%) (FIG. 15). O método kDNA snPCR conseguiu detectar 21 cães positivos (91,3%) e 40 amostras positivas (86,9%) (FIG. 17 e 19). Esses dois métodos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Os dois métodos com alvos na região do gene do RNAr também apresentaram resultados semelhantes, porém inferiores aos citados anteriormente. O método LnPCR (FIG. 21 e 23) conseguiu alcançar 17 cães positivos (73,9%) e 30 amostras positivas (65,2%). Já o ITS1 nPCR (FIG. 25 e 27) obteve 16 cães positivos, e o número de amostras positivas foi de 28 (60,9%). Não houve diferença estatística entre esses dois métodos ($p > 0,05$). A sensibilidade dos métodos baseados no kDNA (kDNA PCR-Hibridização e kDNA snPCR) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a dos métodos baseados nos genes do RNA ribossomal (LnPCR e ITS1 nPCR). Esses resultados não se correlacionaram bem com os obtidos a partir de DNA purificado de *L. (L.) chagasi*, onde os métodos LnPCR e ITS1 nPCR obtiveram sensibilidades semelhantes ao kDNA PCR-Hibridização.

Além da avaliação da sensibilidade dos métodos foi verificado também quais espécies de *Leishmania* estariam infectando os cães do estudo. Com a realização da técnica de RFLP, utilizando a enzima de restrição *HaeIII* para digerir os produtos de PCR da segunda amplificação do método ITS1 nPCR, verificamos que todos os cães ITS1 nPCR positivos estavam infectados por *L. (L.) chagasi* (FIG. 28).

Em todas as reações de PCR realizadas neste estudo os controles negativos não apresentaram qualquer amplificação e os controles positivos apresentaram a banda esperada, demonstrando não ter havido contaminação ou inibição das reações.

Os resultados descritos acima estão consolidados na TAB. 3. Os gráficos das FIG. 29 e 30 mostram respectivamente as porcentagens de cães e amostras positivas de cada etapa dos métodos analisados.

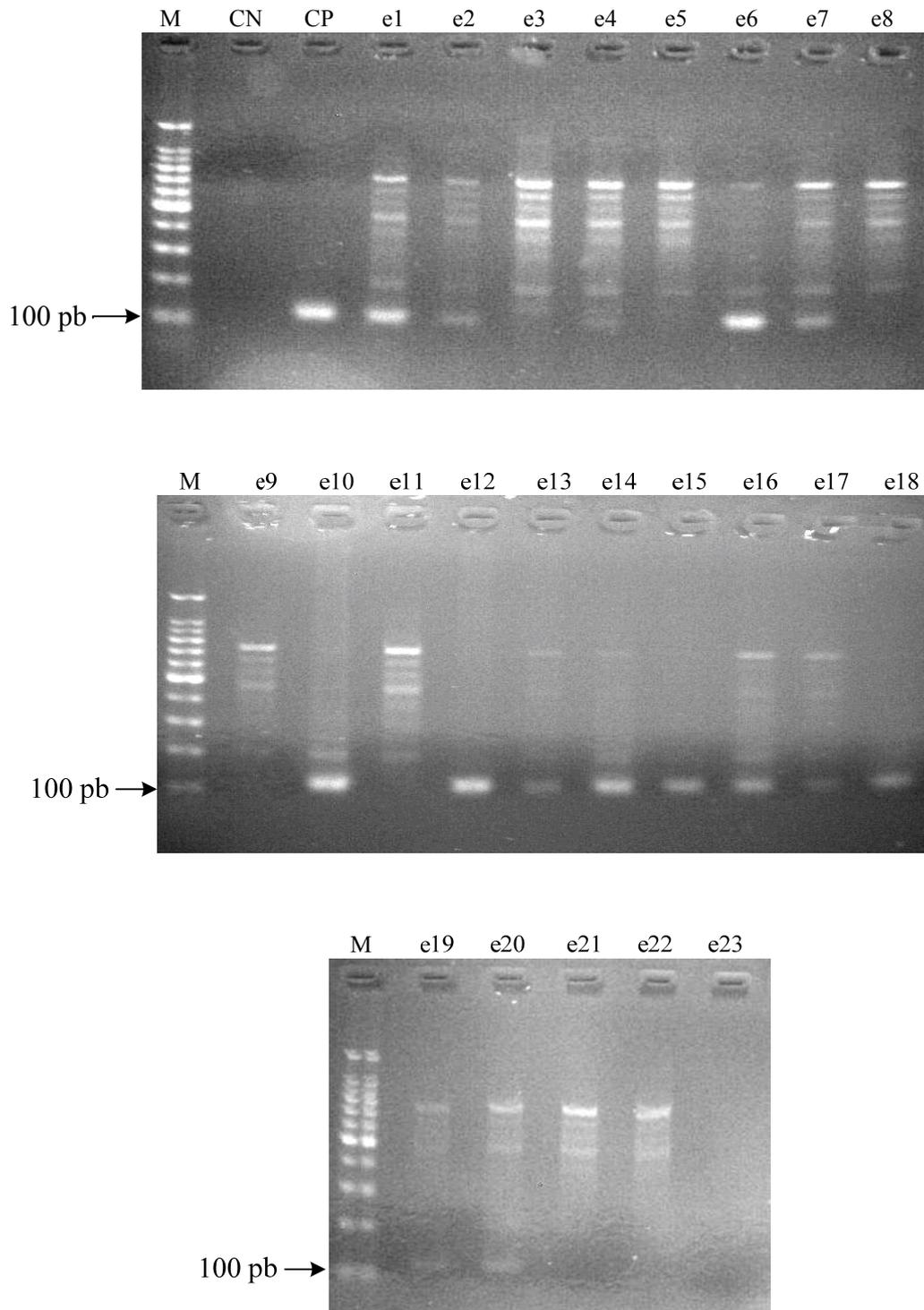


Figura 13: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Neste grupo (1) a extração do DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio. Produto amplificado apresenta 120 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

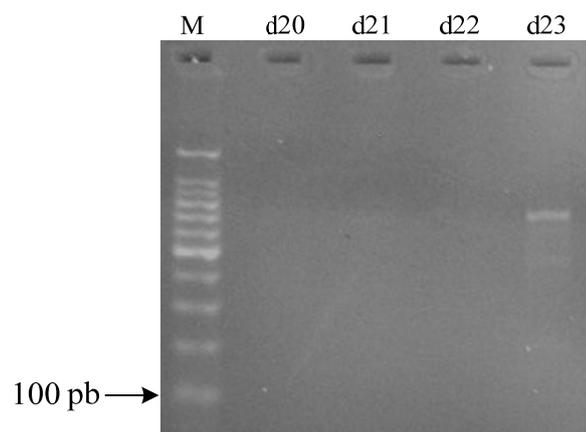
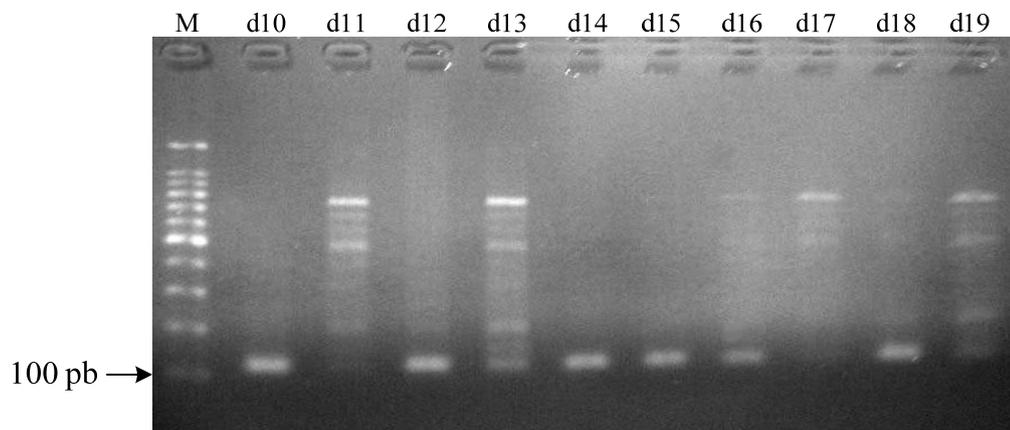
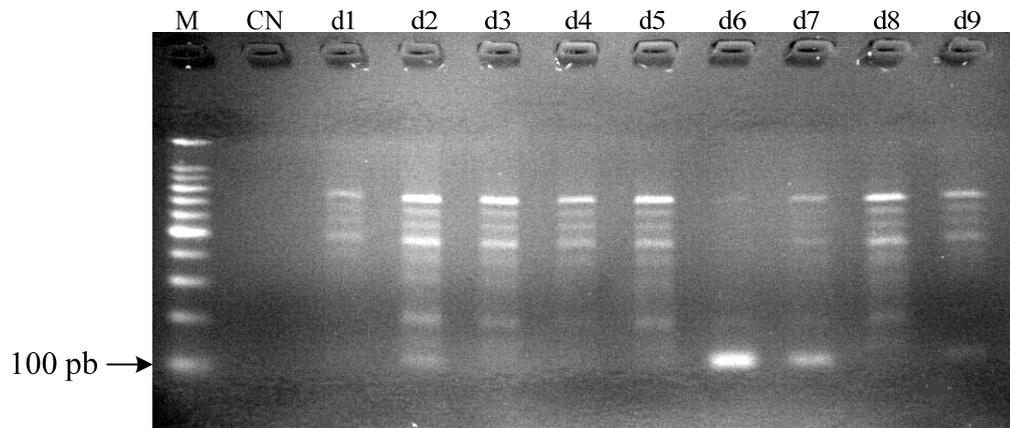


Figura 14: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Neste grupo (1) a extração do DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio. Produto amplificado apresenta 120 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA. **d1-d23:** amostras de cães.

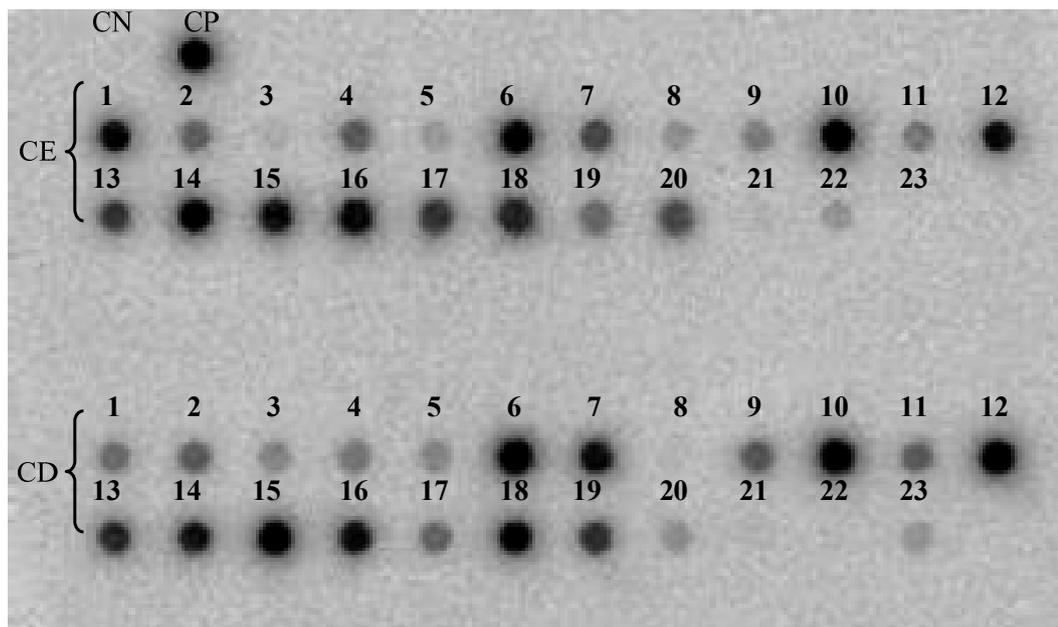


Figura 15: Hibridização dos produtos de PCR referentes aos *swabs* conjuntivais dos cães do grupo 1.

Os produtos de PCR foram hibridizados com sondas de minicírculos clonados de kDNA de *Leishmania (Leishmania) chagasi* marcadas com ^{32}P . **CN:** controle negativo sem DNA. **CP:** controle positivo para *L. (L.) chagasi* (MHOM/1973/BH46). **CE:** conjuntiva esquerda. **CD:** conjuntiva direita. **1 - 23:** amostras de cães.

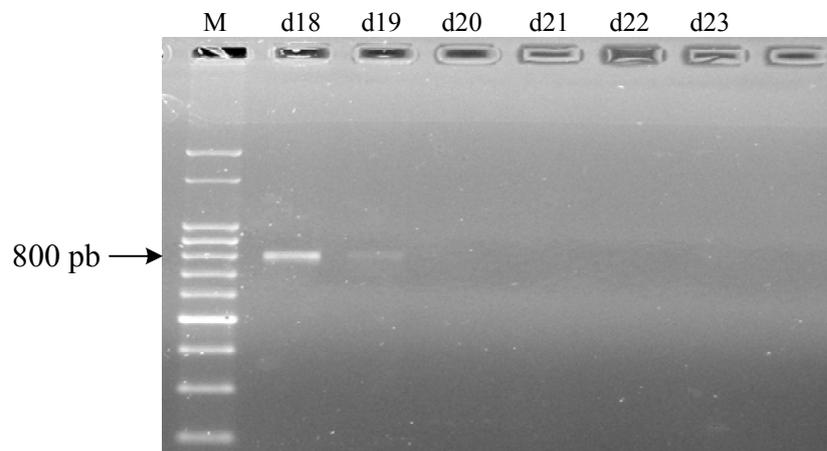
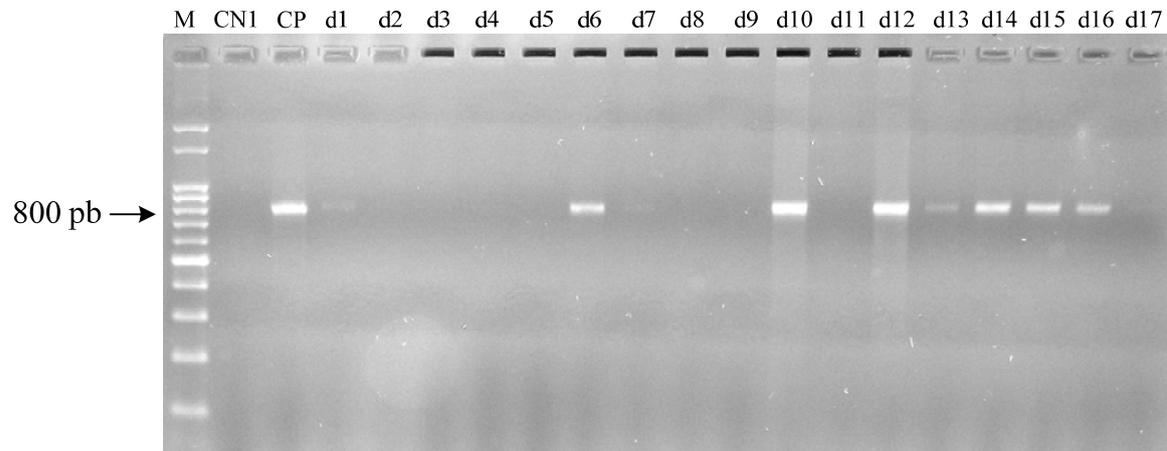


Figura 16: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Neste grupo (1) a extração do DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio. Produto amplificado apresenta 800 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

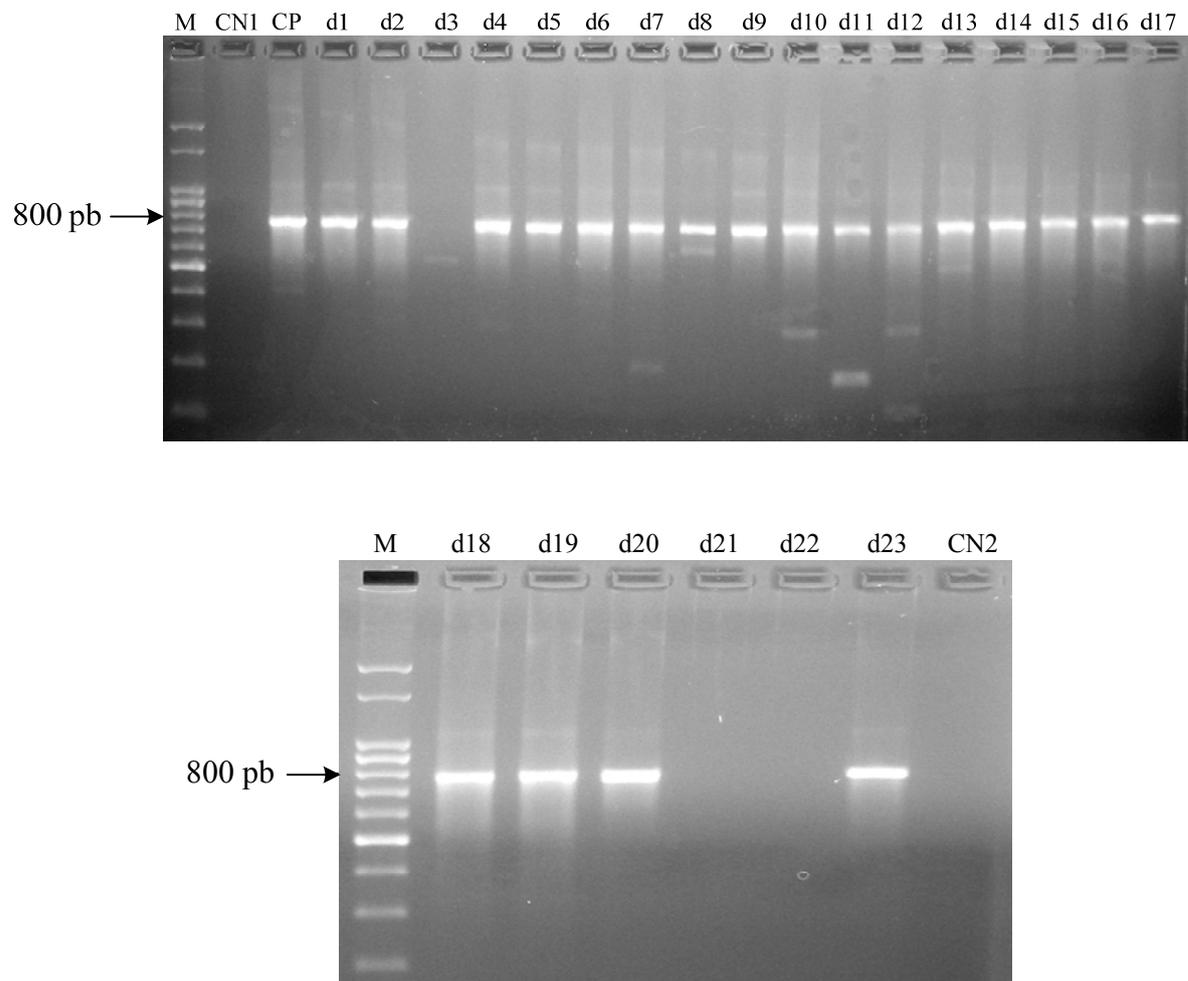


Figura 17: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Neste grupo (1) a extração do DNA foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio. Produto amplificado apresenta 780 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

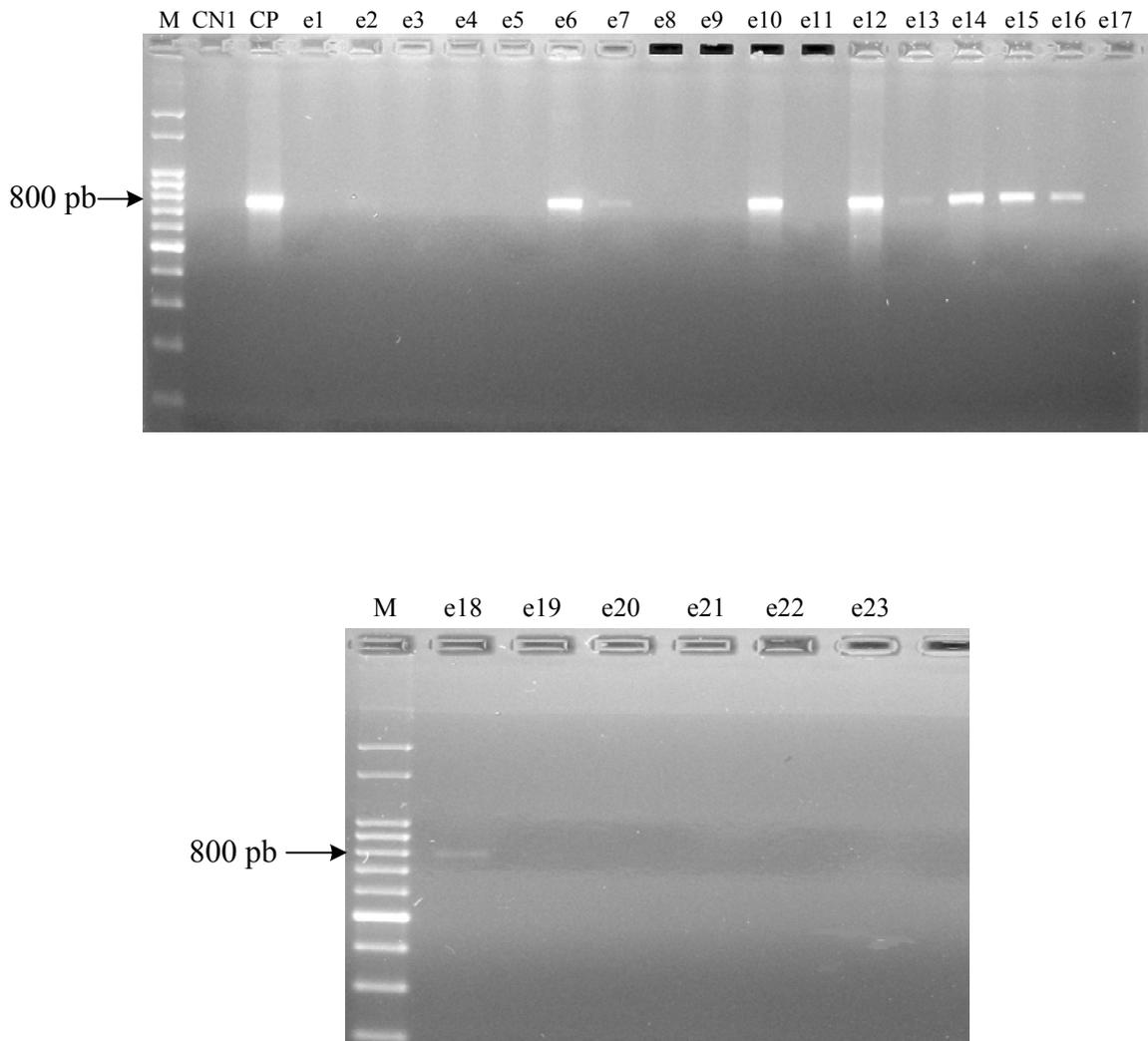


Figura 18: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 800 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

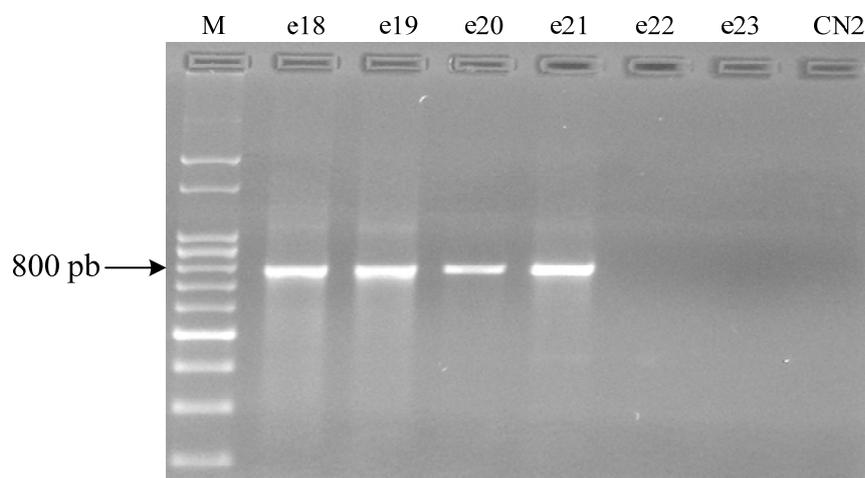
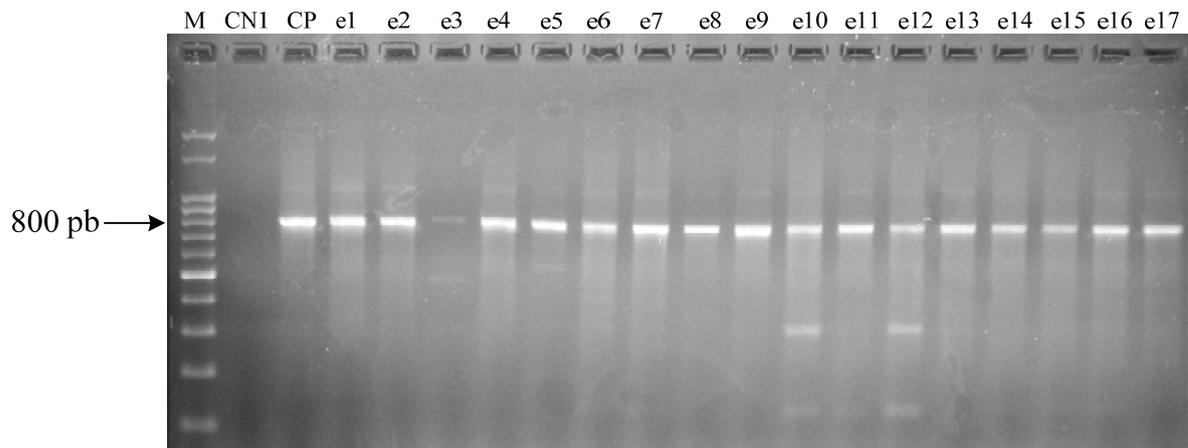


Figura 19: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 780 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

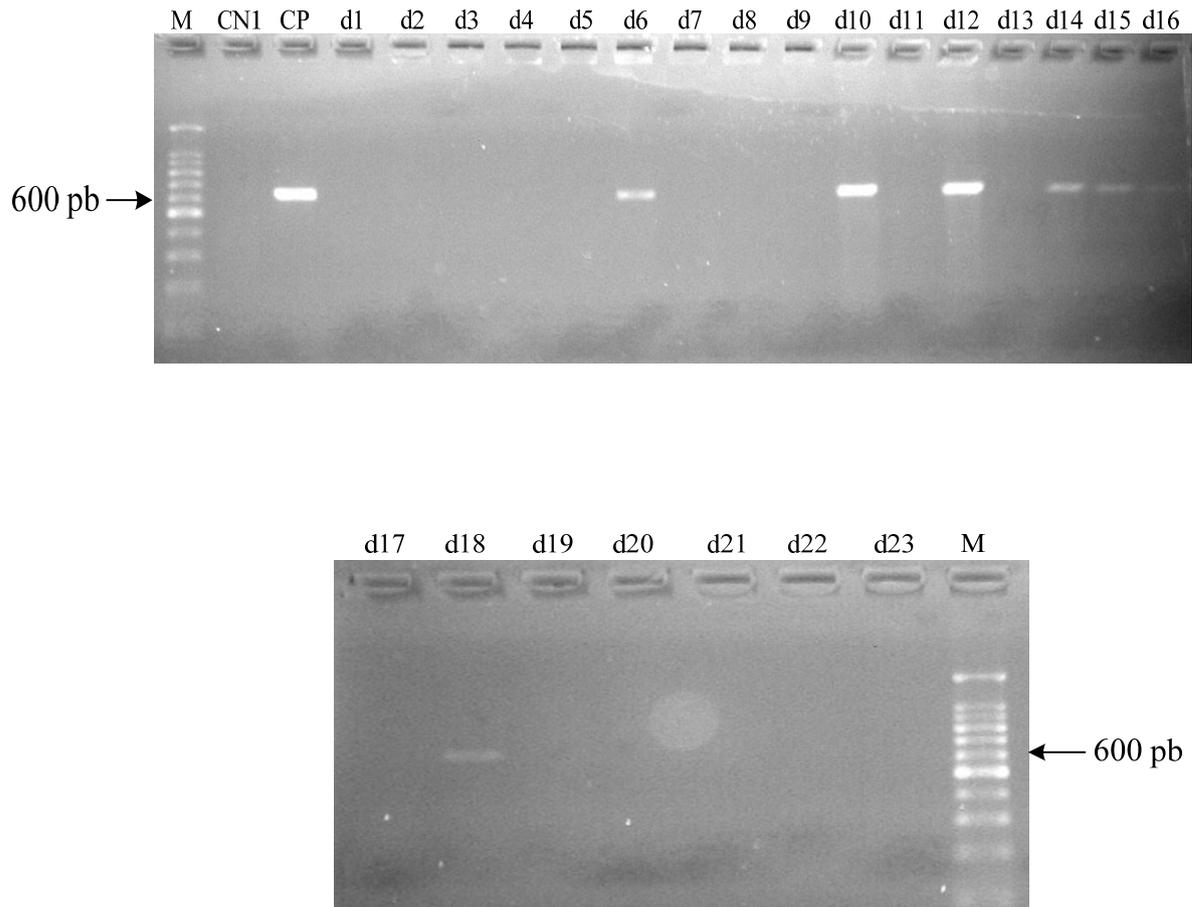


Figura 20: Gel de agarose 2% dos produtos da 1^a reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 603 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1^a reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1-d23:** amostras de cães.

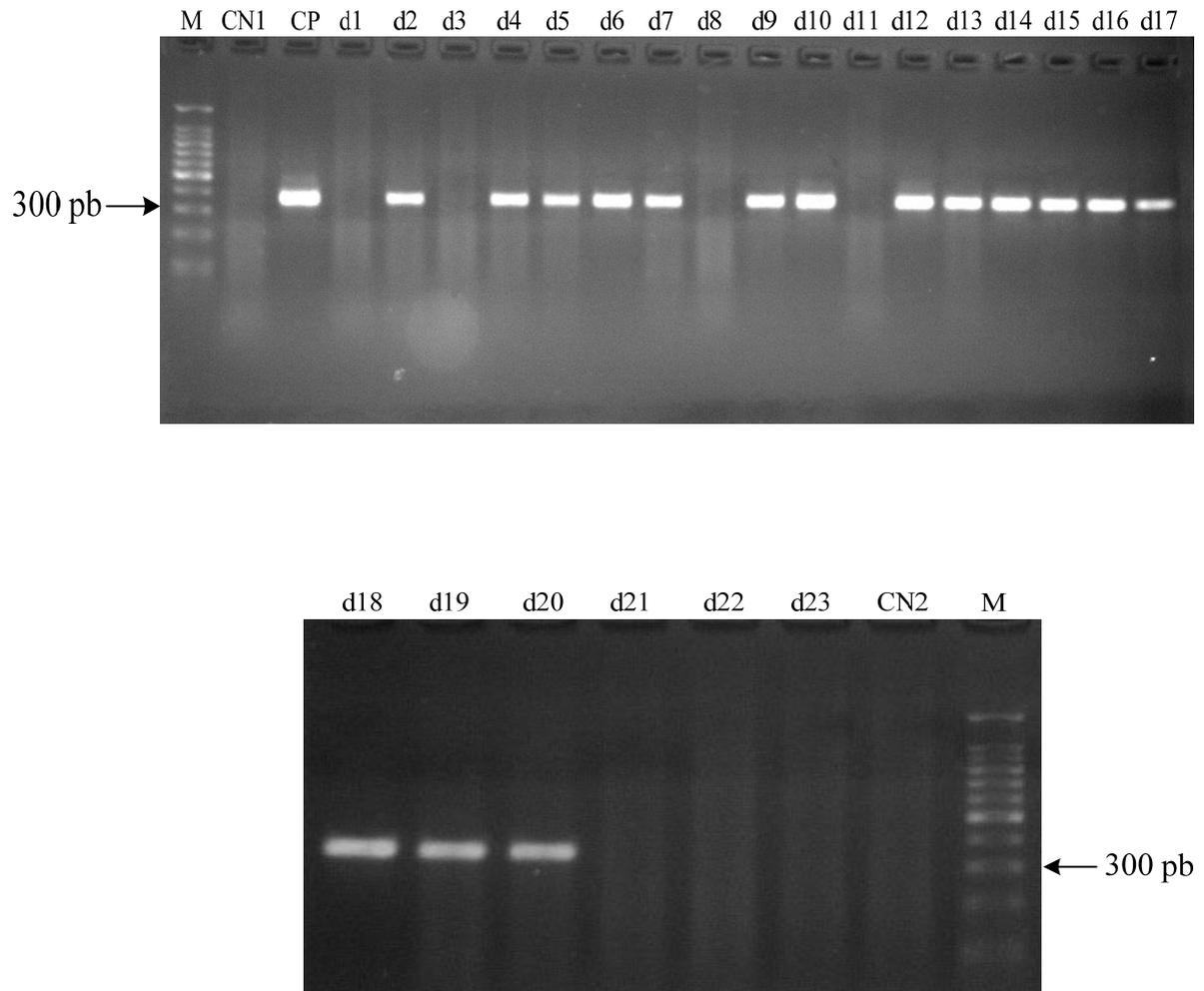


Figura 21: Gel de agarose 2% dos produtos da 2^a reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1^a reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2^a reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1-d23:** amostras de cães.

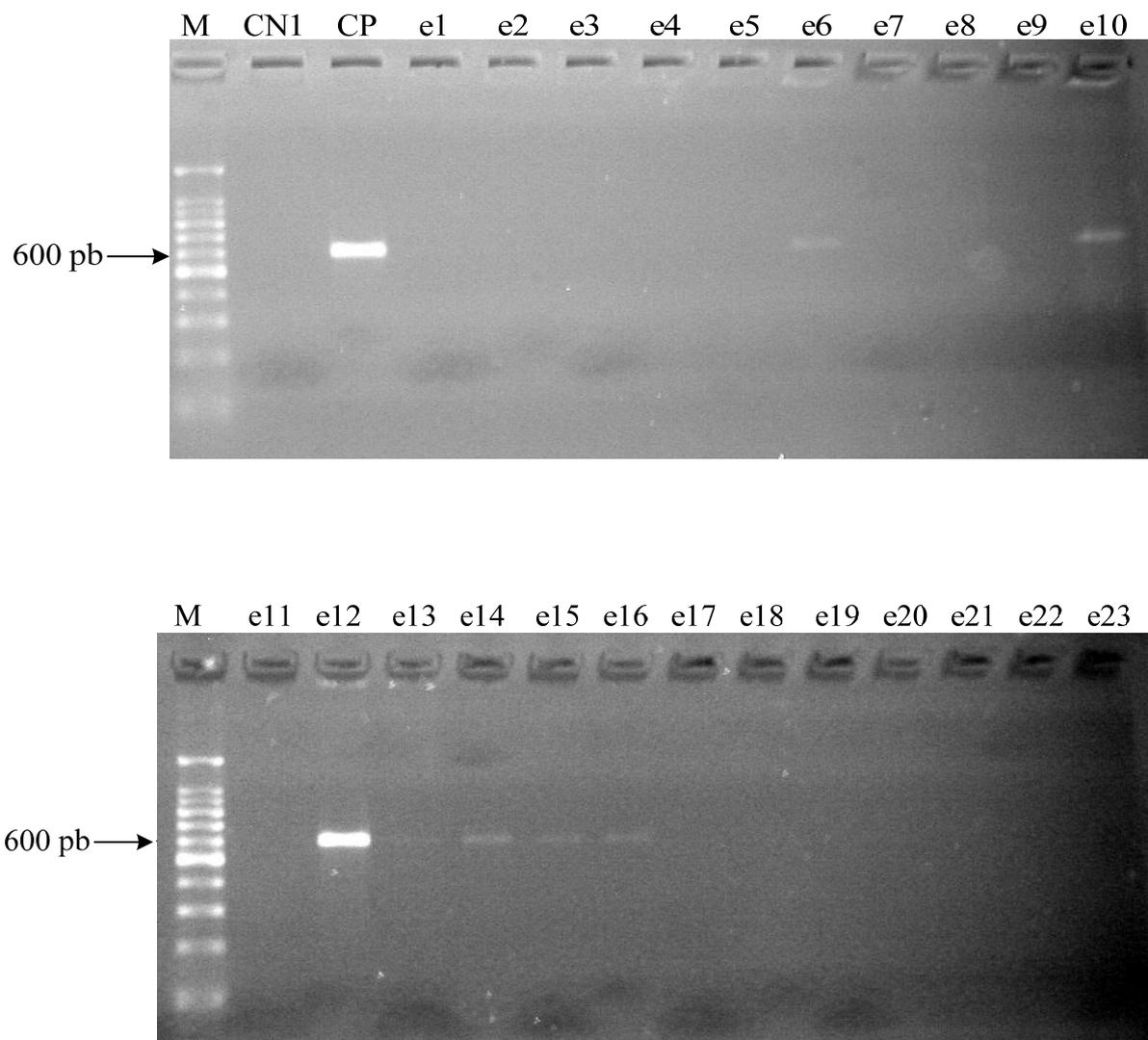


Figura 22: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 603 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

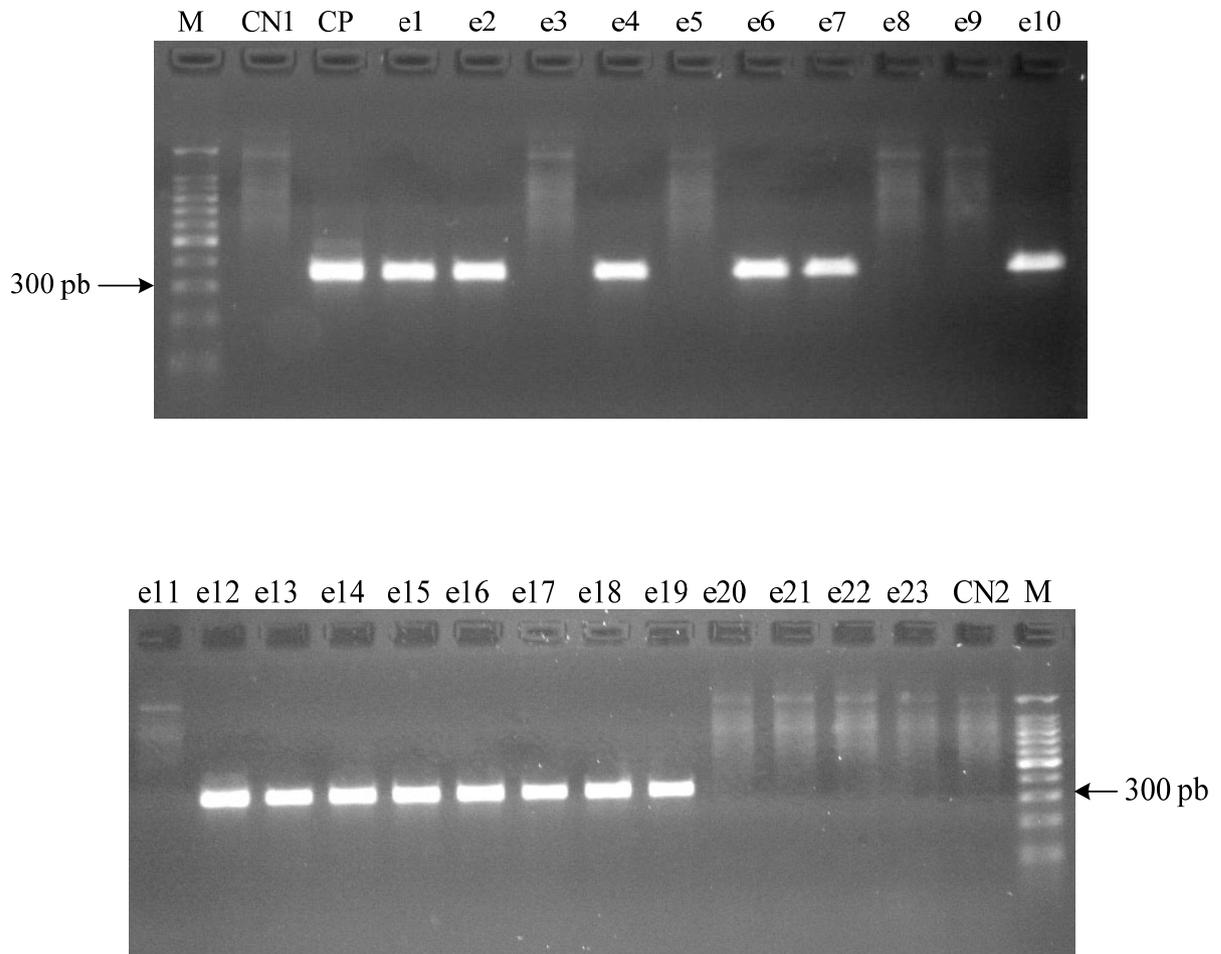


Figura 23: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

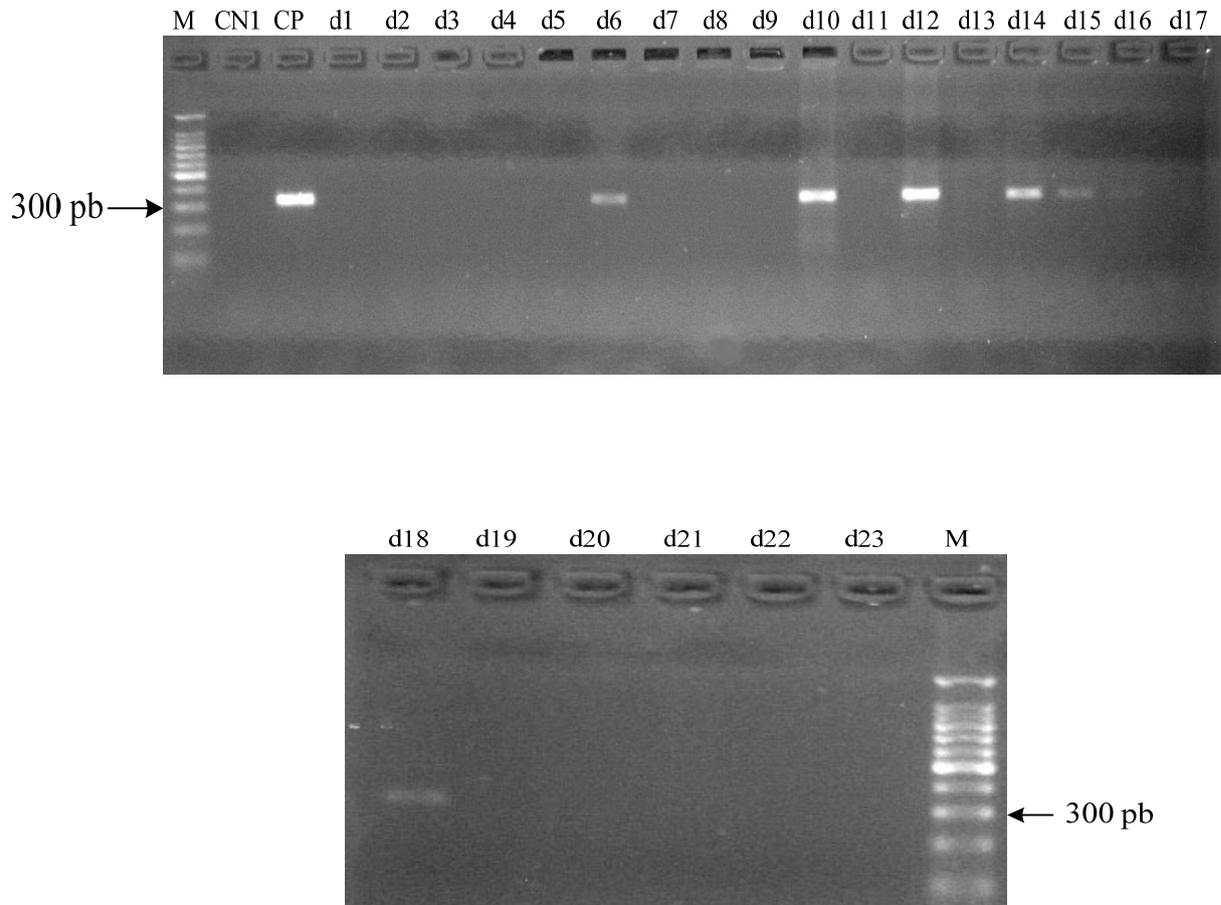


Figura 24: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

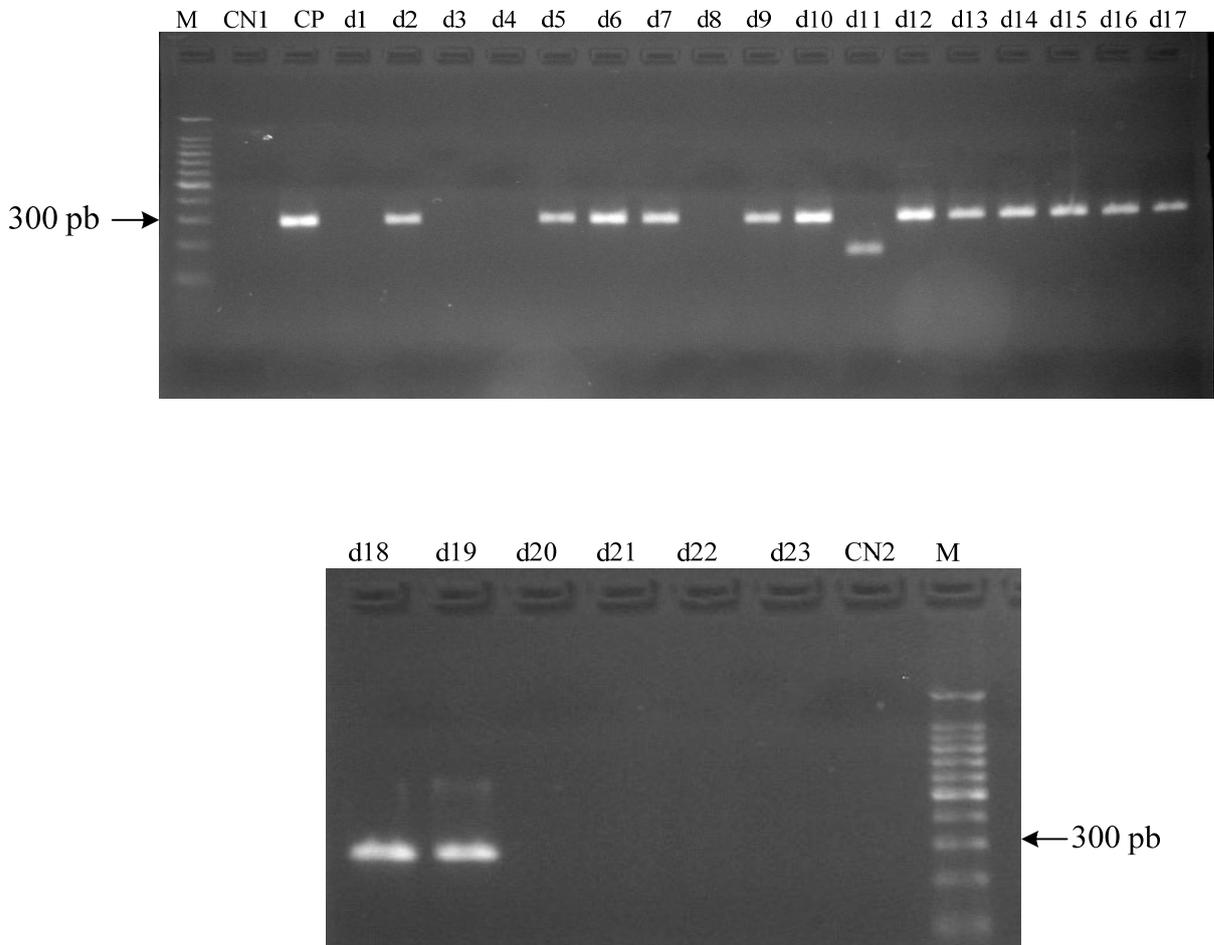


Figura 25: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta de 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

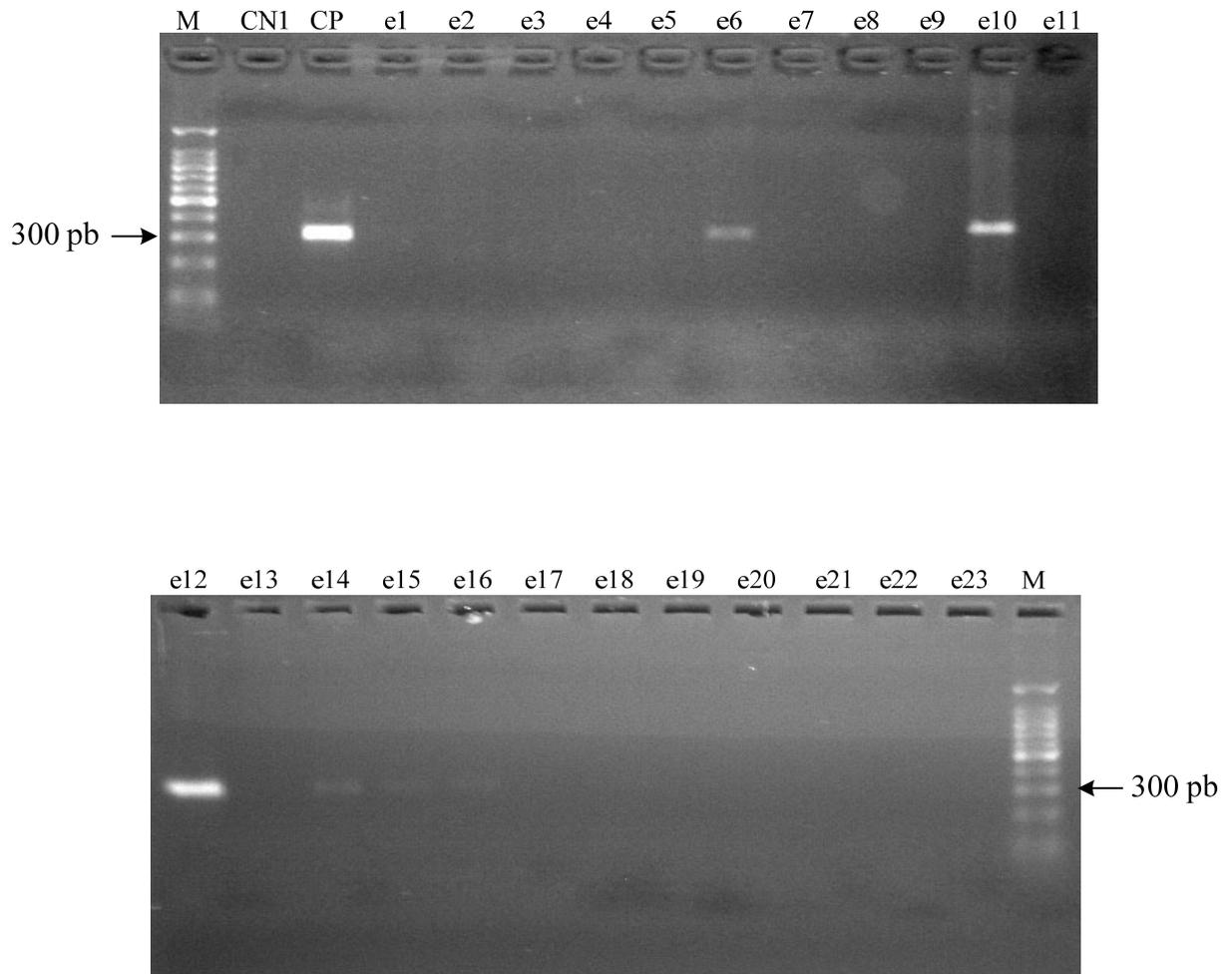


Figura 26: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

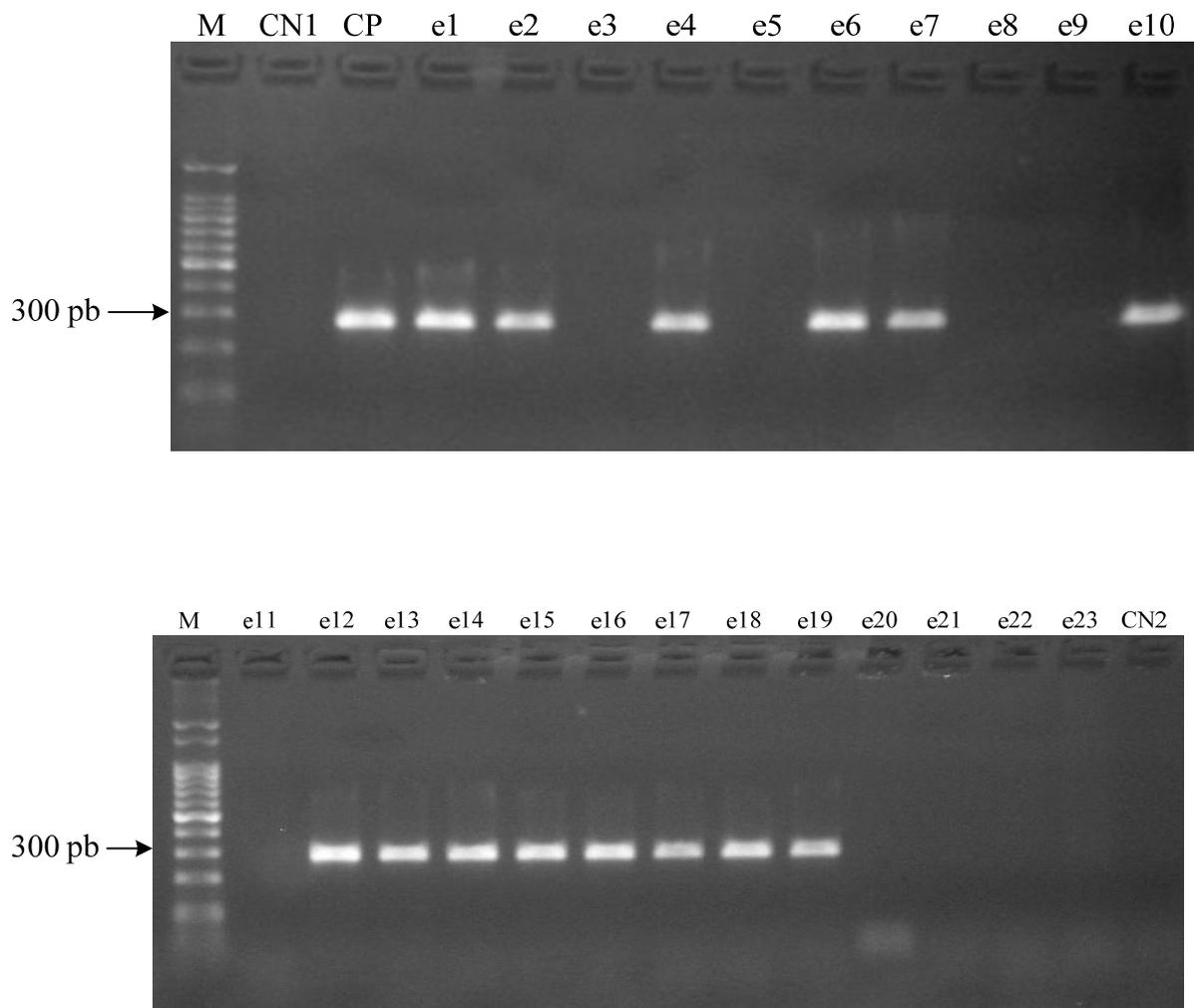


Figura 27: Gel de agarose 2% dos produtos da 2^a reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 1.

Produto amplificado apresenta de 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1^a reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2^a reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

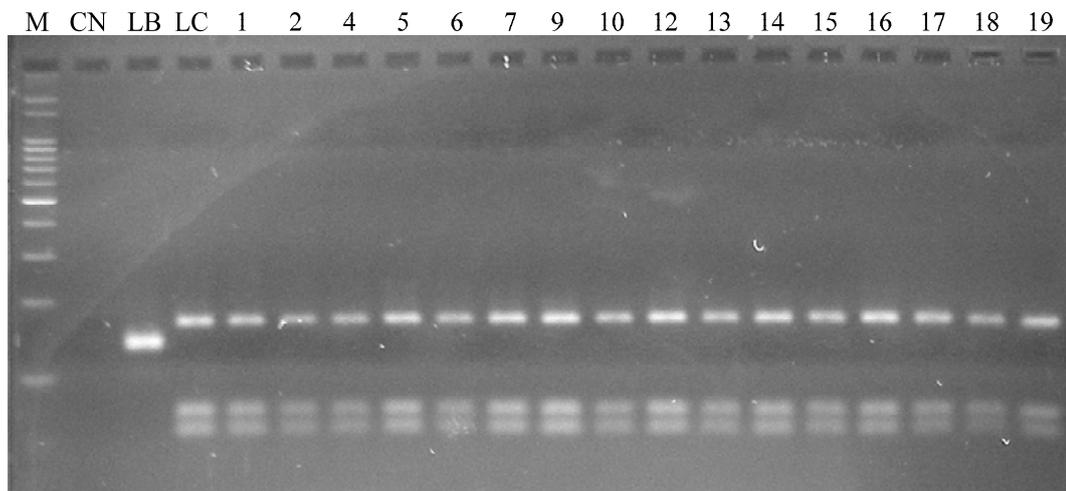


Figura 28: Gel de agarose 2% da análise por RFLP dos produtos de PCR obtidos por ITS1 nPCR das amostras dos cães do grupo 1.

Resultado obtido pela digestão dos produtos de PCR da 2ª reação do método ITS1 nPCR, das amostras dos cães do grupo 1, utilizando-se a enzima de restrição *Hae III*. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA. **LB:** controle positivo para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). **LC:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **1 - 19:** amostras de cães positivos para a 2ª reação do método ITS1 nPCR.

Tabela 3: Resultados dos *swabs* conjuntivais dos cães do grupo 1 (DNA extraído por fenol-clorofórmio)

		CÃES GRUPO 1 (FENOL-CLOROFÓRMIO)																							Total de cães positivos	Total de amostras positivas*											
MÉTODO	ETAPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23													
		E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D												
kDNA - Hibridização	PCR	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	27
	Hibr.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	40
kDNA snPCR	1ª reação	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	11	19
	2ª reação	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	40
LnPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	7	13
	2ª reação	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	30
ITS1 nPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	7	13
	2ª reação	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	28

E : Ocular Esquerda
 D : Ocular Direita
 + : Resultado Positivo
 - : Resultado Negativo
 *: considerando oculares esquerda e direita

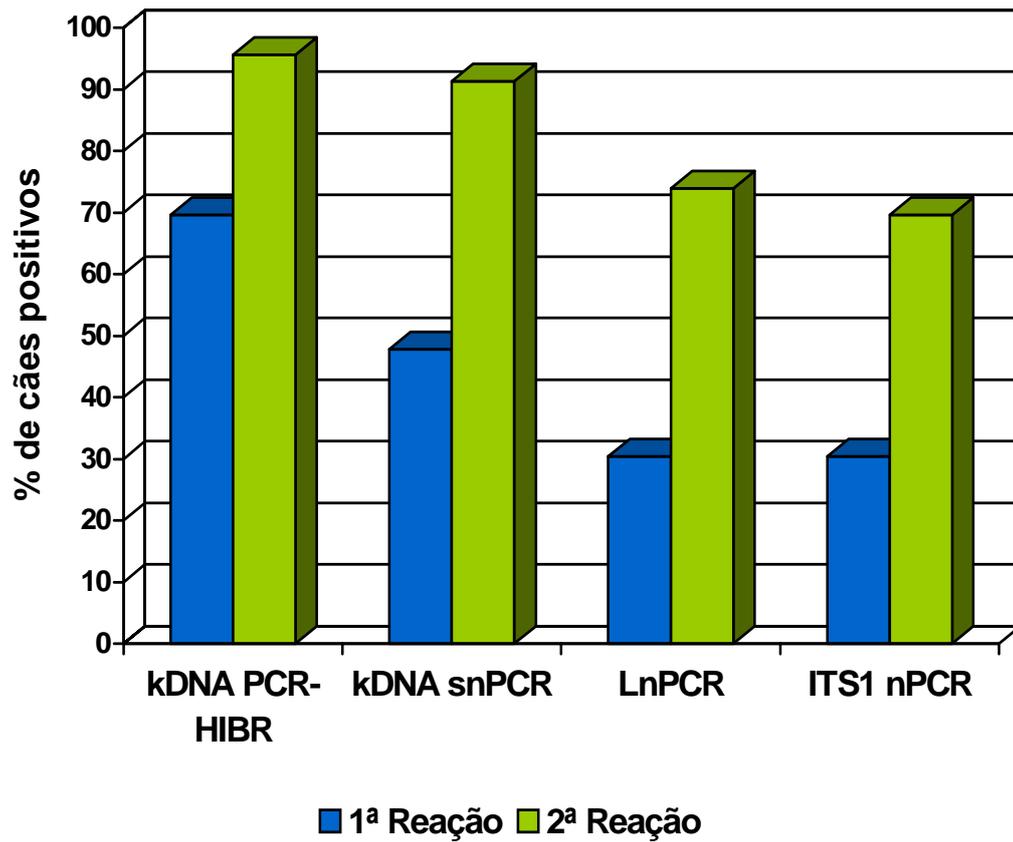


Figura 29: Porcentagem de cães positivos do grupo 1 (DNA extraído por fenol-clorofórmio) na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.

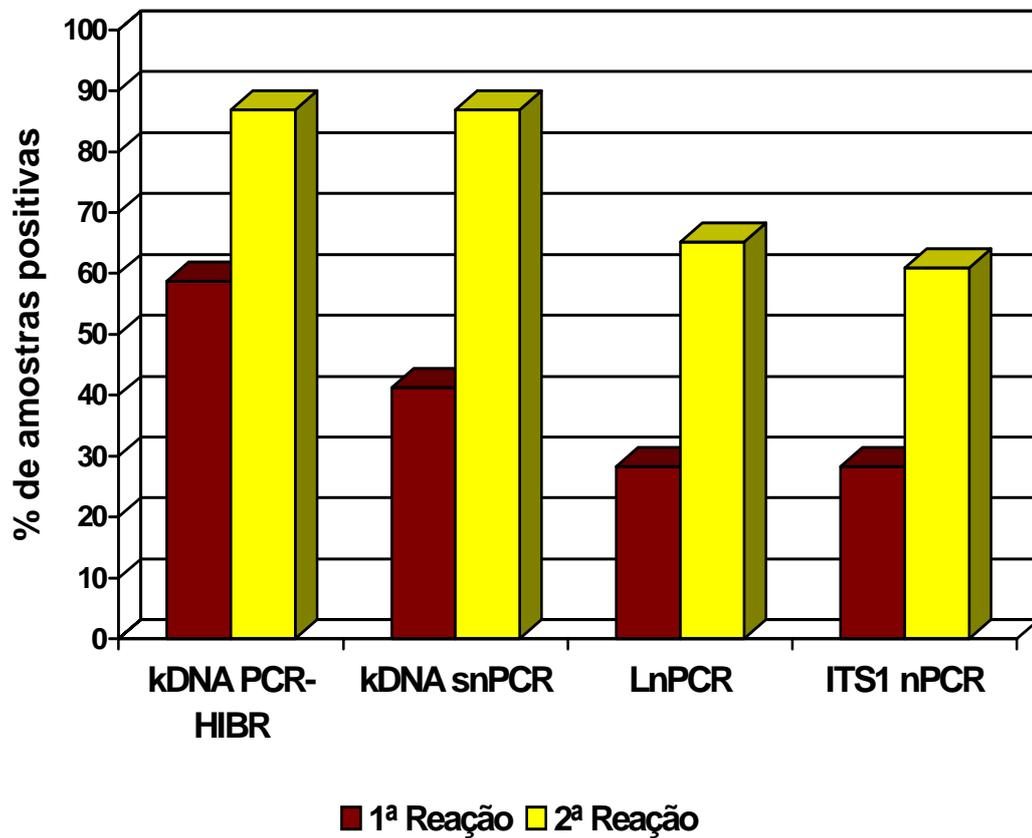


Figura 30: Porcentagem das amostras positivas das oculares esquerda e direita do grupo 1 (DNA extraído por fenol-clorofórmio) na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.

6.4) Avaliação da sensibilidade dos métodos de PCR utilizando-se o DNA de amostras clínicas, obtidas pelo método do *swab* conjuntival, e extraído pelo método de fervura (GRUPO 2)

O grupo 2 também é composto por 23 cães. Neste grupo o DNA das amostras das conjuntivas foi extraído dos *swabs* pelo método de fervura.

Os métodos de PCR foram analisados nas mesmas condições utilizadas para o grupo 1.

Na primeira etapa o único método que apresentou amplificação foi o kDNA PCR – Hibridização. Conforme os resultados apresentados no gel de agarose (FIG. 31 e 32) foi possível detectar 11 cães positivos correspondendo a 47,8% do total de cães e 18 amostras positivas (39,1%) do total das amostras das oculares esquerda e direita. Os demais métodos não conseguiram obter qualquer resultado conforme visto nos géis de agarose do kDNA snPCR (FIG. 34 e 36), LnPCR (FIG. 38 e 40) e ITS1 nPCR (FIG. 42 e 44).

A segunda etapa permitiu uma melhora nos resultados de todos os métodos. Nessa etapa o método kDNA PCR – Hibridização manteve o melhor índice de positividade. A Hibridização conseguiu detectar 18 cães positivos (78,3%) e 31 amostras positivas (67,4%) (FIG. 33). Os outros métodos apresentaram resultados positivos, porém o índice foi inferior quando comparado ao obtido pelo kDNA PCR – Hibridização ($p < 0,05$). O método ITS1 nPCR detectou 8 cães positivos (34,8%) e 11 amostras (23,9%) (FIG. 43 e 45). Os métodos kDNA snPCR e LnPCR apresentaram resultados inferiores ao esperado. O kDNA snPCR conseguiu detectar 10 cães positivos (43,5%) e 14 amostras (30,4%) (FIG. 35 e 37) e o LnPCR conseguiu apenas 2 cães (8,7%) e 3 amostras (6,5%) (FIG. 39 e 41). Não houve diferença estatística entre os métodos ITS1 nPCR e kDNA snPCR ($p > 0,05$), mas houve quando estes dois métodos foram comparados com LnPCR ($p < 0,05$).

Nesse grupo também foram identificadas as espécies de *Leishmania* presentes nas amostras positivas para o ITS1 nPCR. Através da técnica da RFLP, utilizando a *HaeIII*, verificamos que todos os cães positivos na segunda etapa do ITS1 nPCR também apresentaram *L.(L.) chagasi* (FIG. 46).

Os resultados consolidados são mostrados na TAB. 4 e os gráficos das porcentagens de cães e amostras positivas para cada etapa de cada método estão apresentados respectivamente nas FIG. 47 e 48.

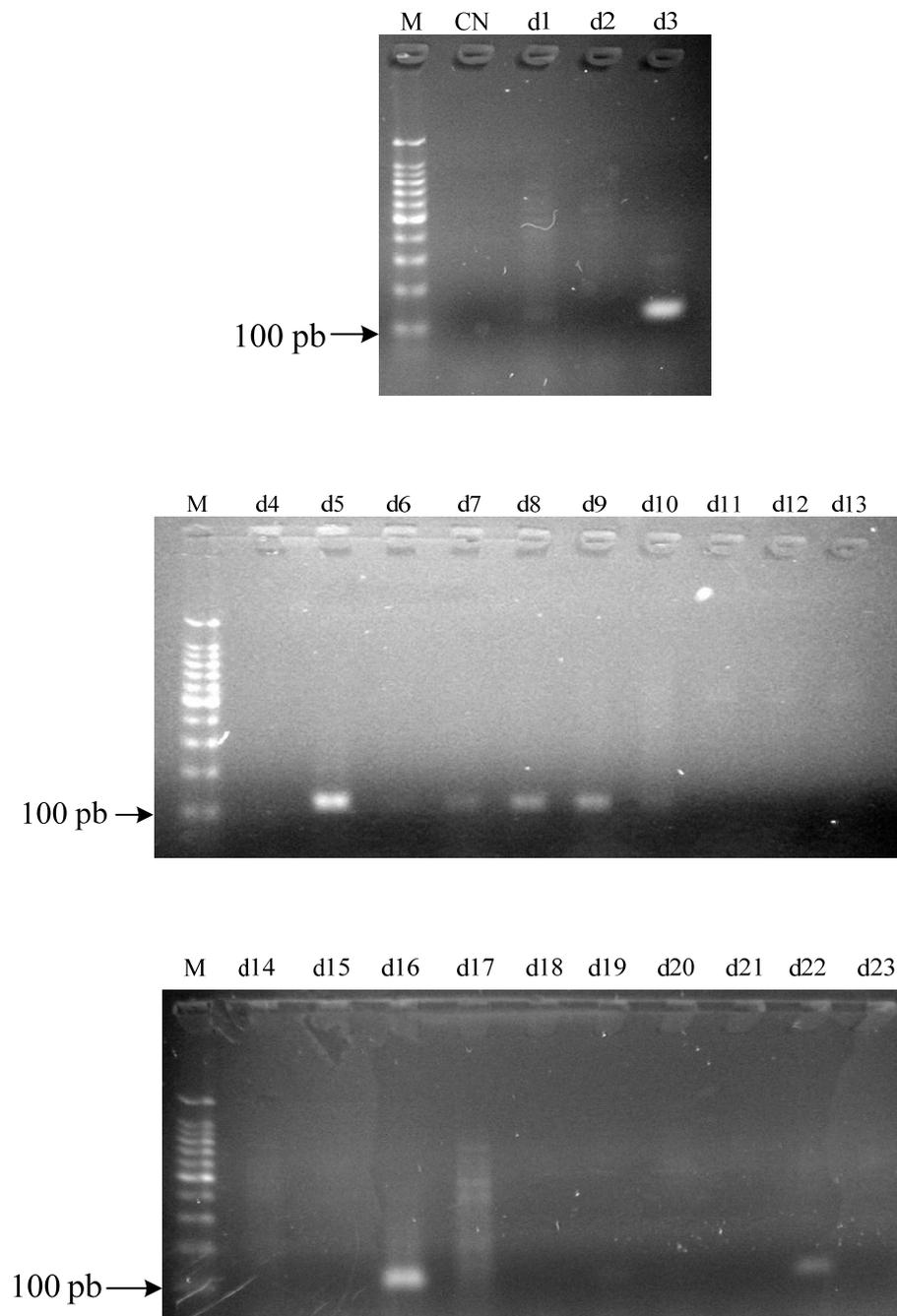


Figura 31: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 120 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

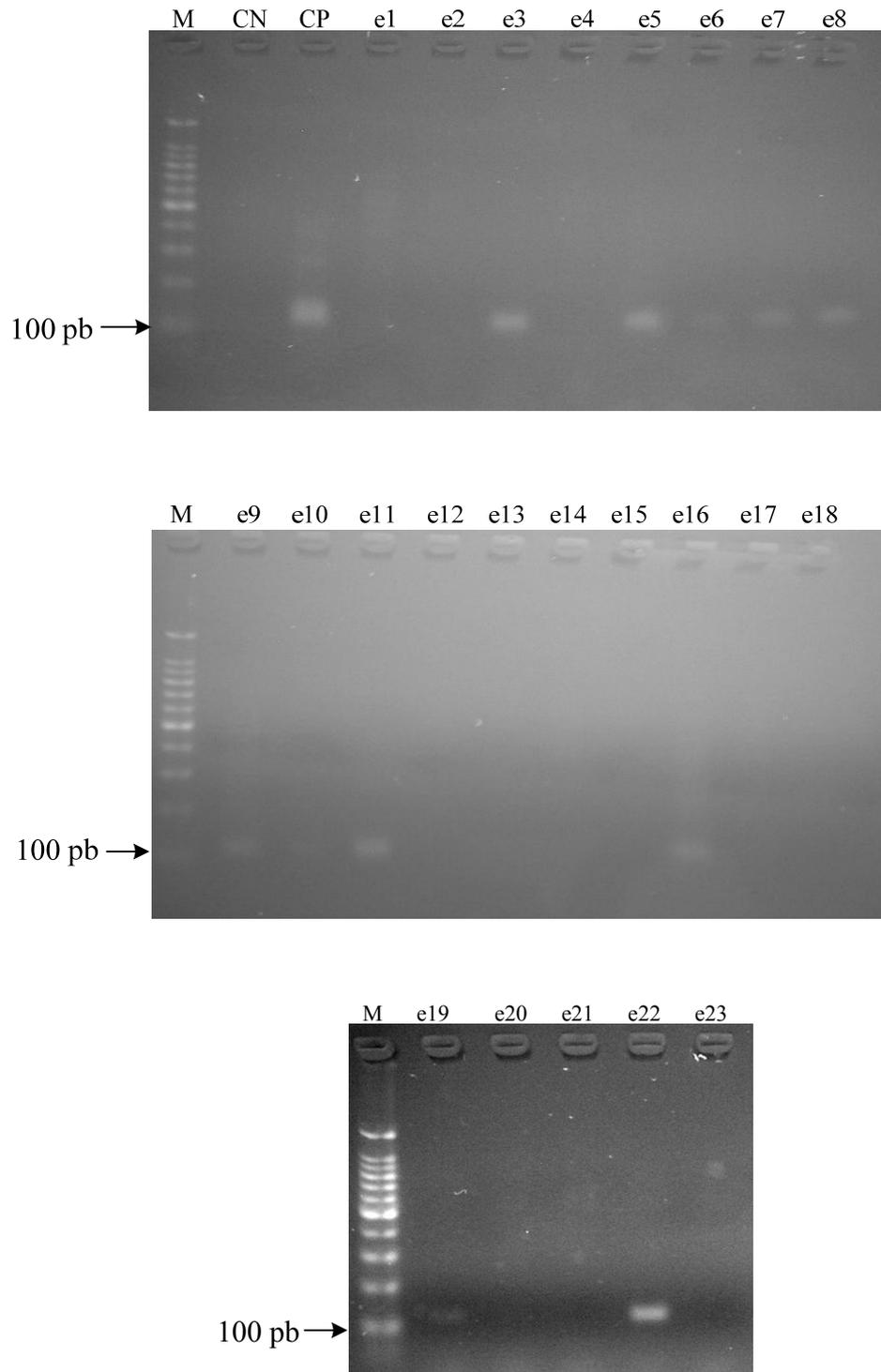


Figura 32: Gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos pelo método kDNA PCR-Hibridização referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 120 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

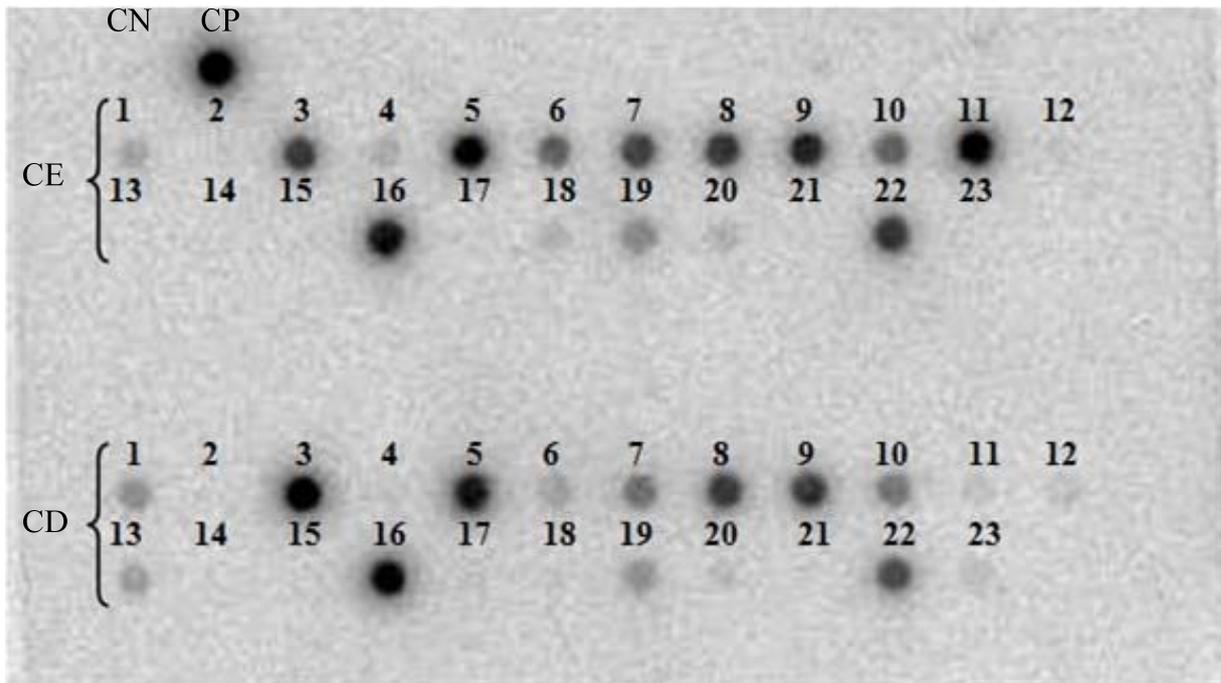


Figura 33: Hibridização com produtos de PCR referentes aos *swabs* conjuntivais dos cães do grupo 2.

Os produtos de PCR foram hibridizados com sondas de minicírculos clonados de kDNA de *Leishmania (Leishmania) chagasi* marcadas com ^{32}P . **CN:** controle negativo sem DNA. **CP:** controle positivo para *L. (L.) chagasi* (MHOM/1973/BH46). **CE:** conjuntiva esquerda. **CD:** conjuntiva direita. **1 - 23:** amostras de cães.

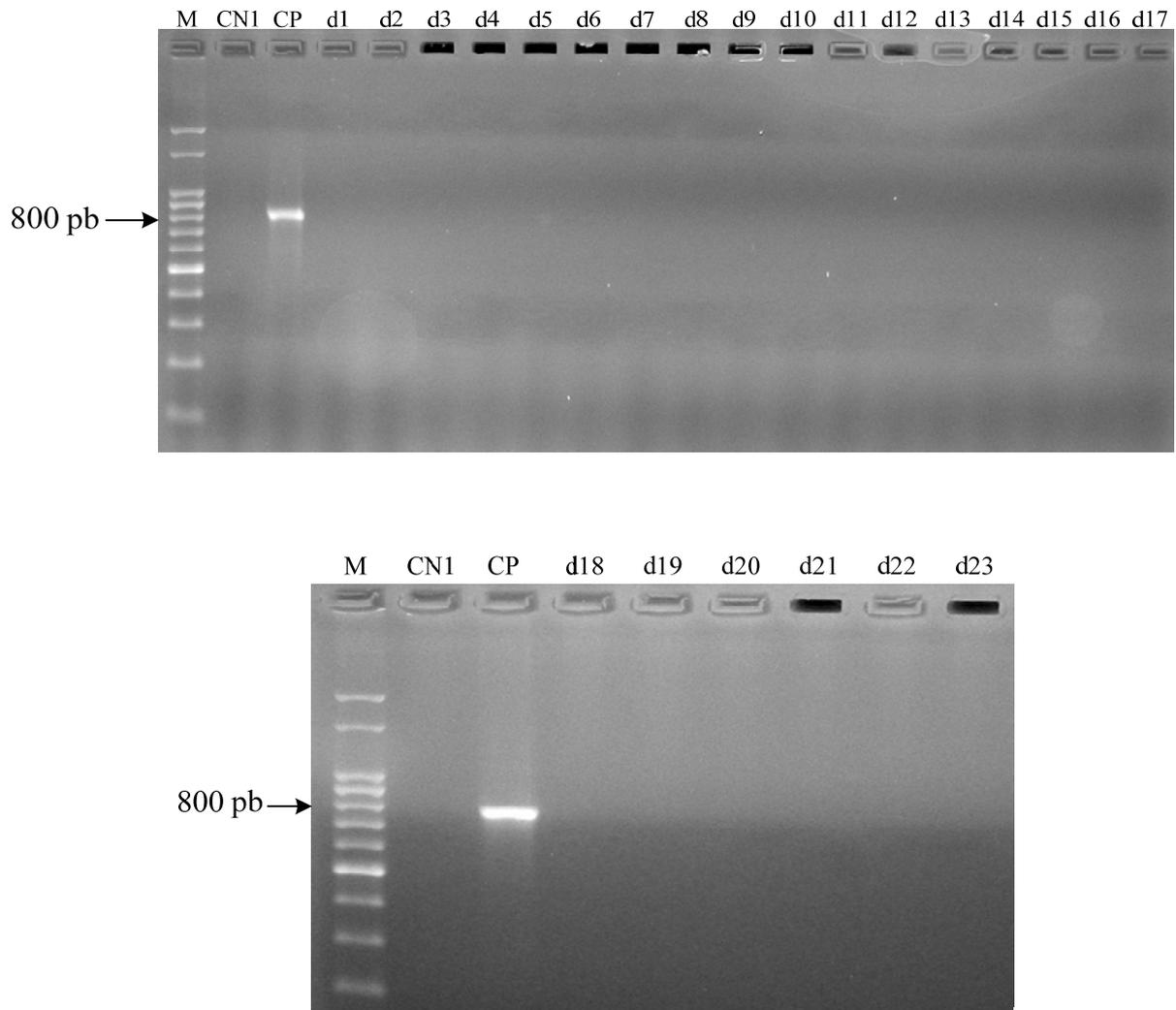


Figura 34: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 800 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

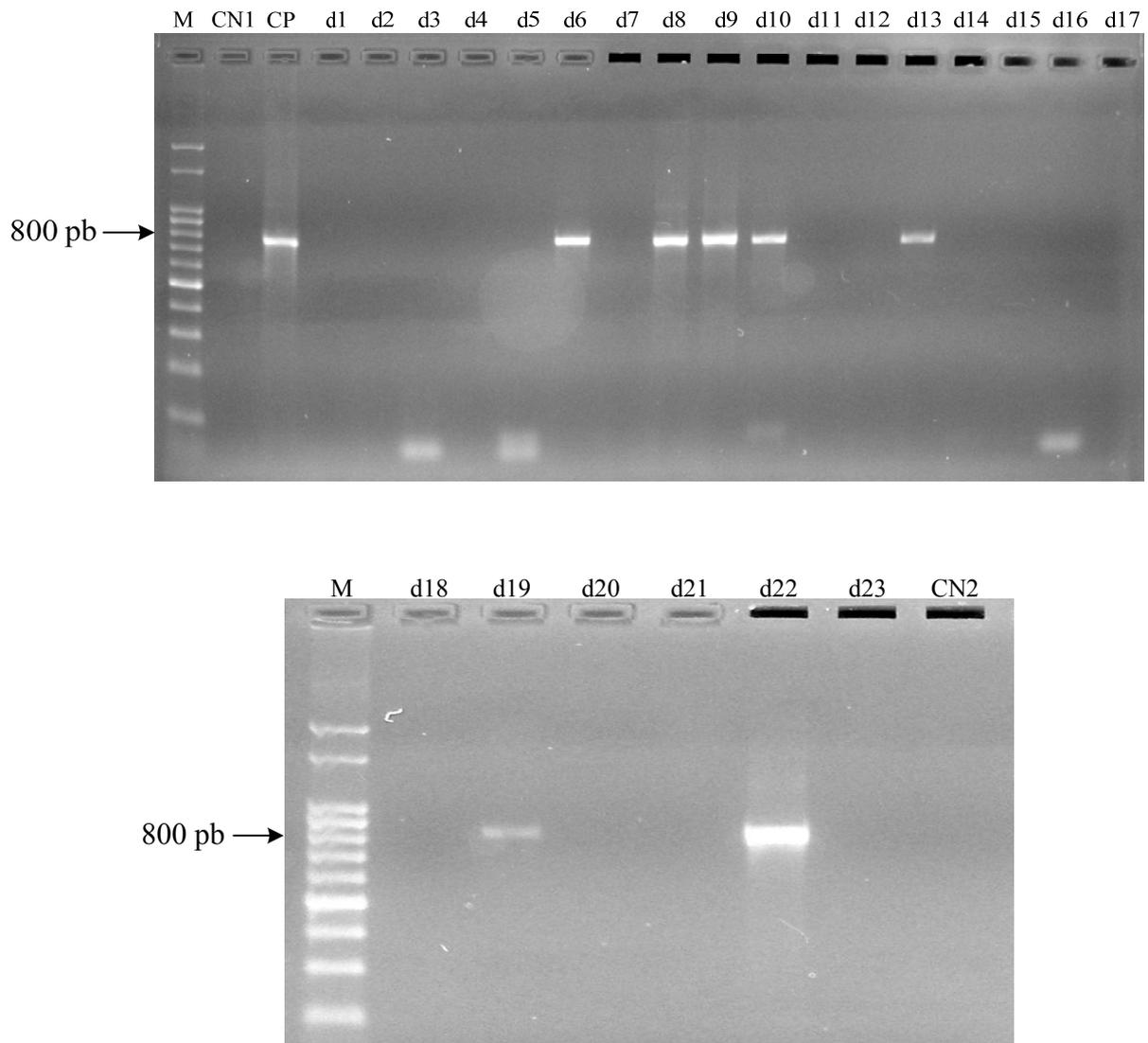


Figura 35: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 780 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

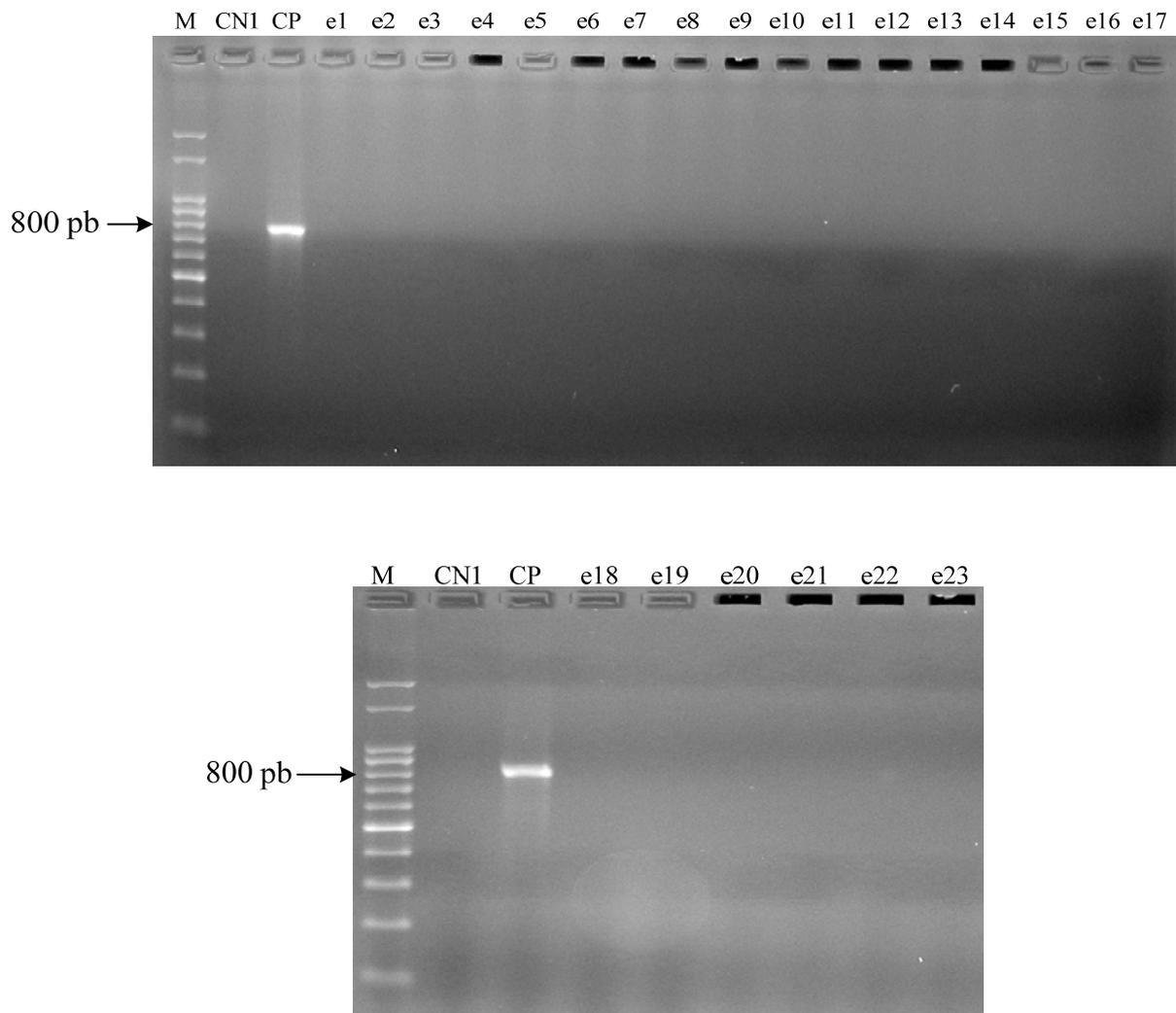


Figura 36: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 800 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

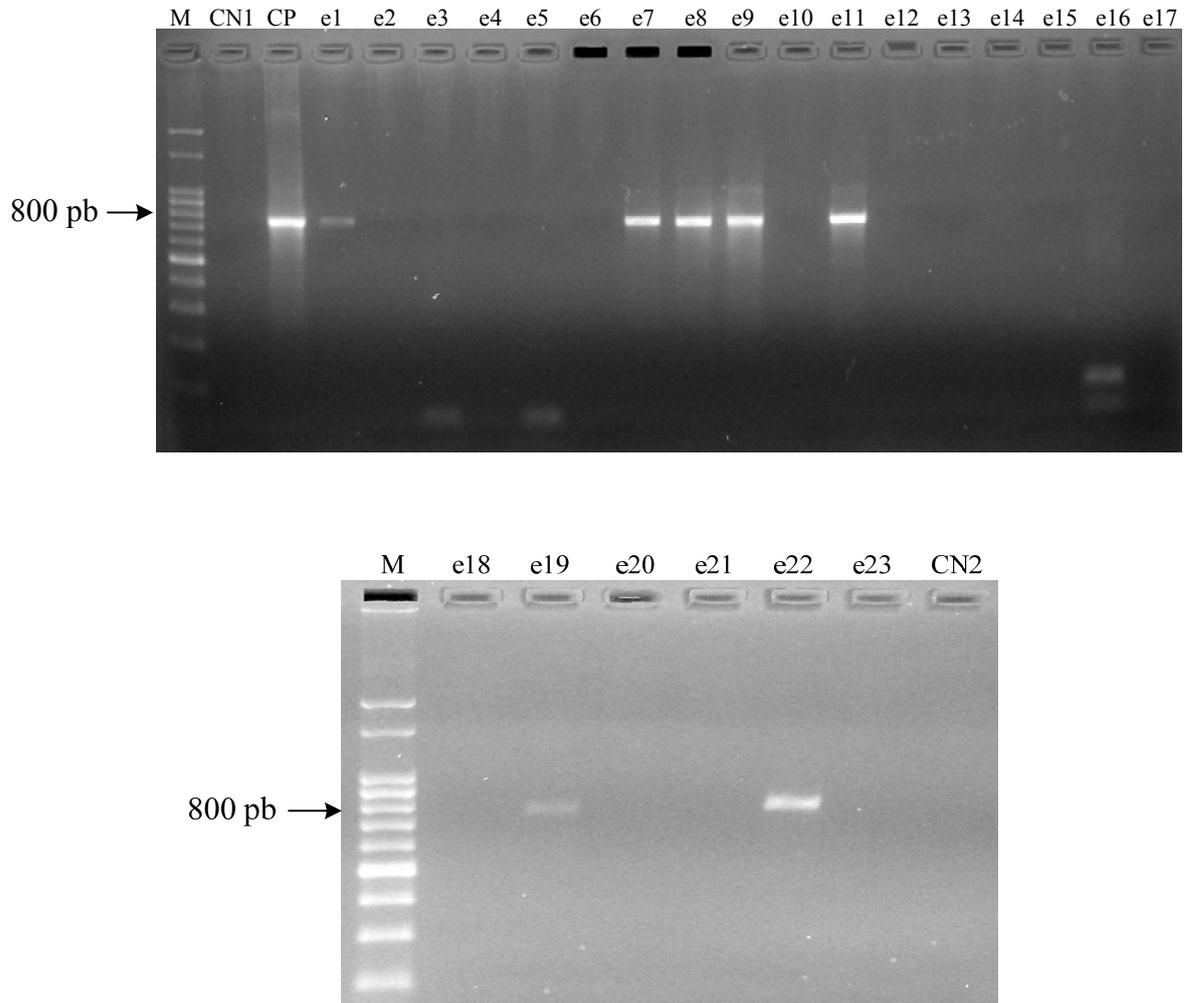


Figura 37: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método kDNA snPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Neste grupo (2) a extração do DNA foi realizada pelo método fervura. Produto amplificado apresenta 780 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

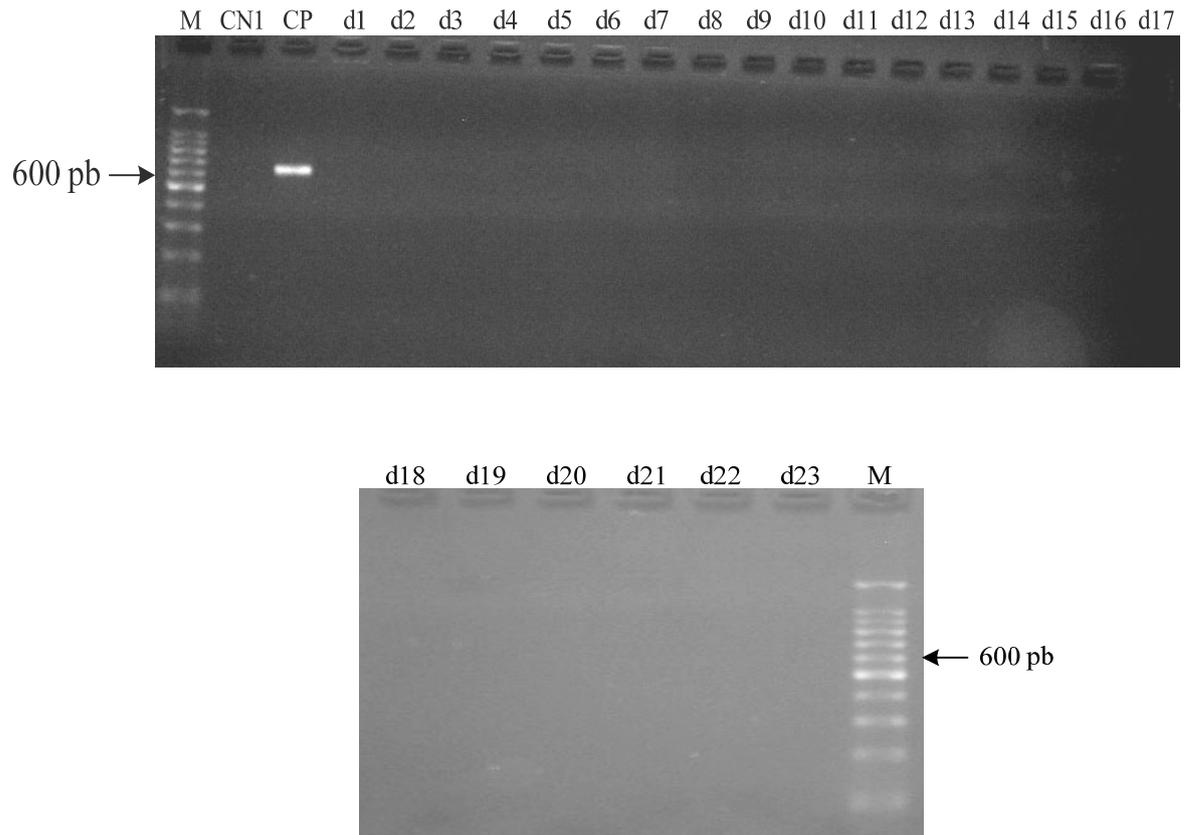


Figura 38: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta 603 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

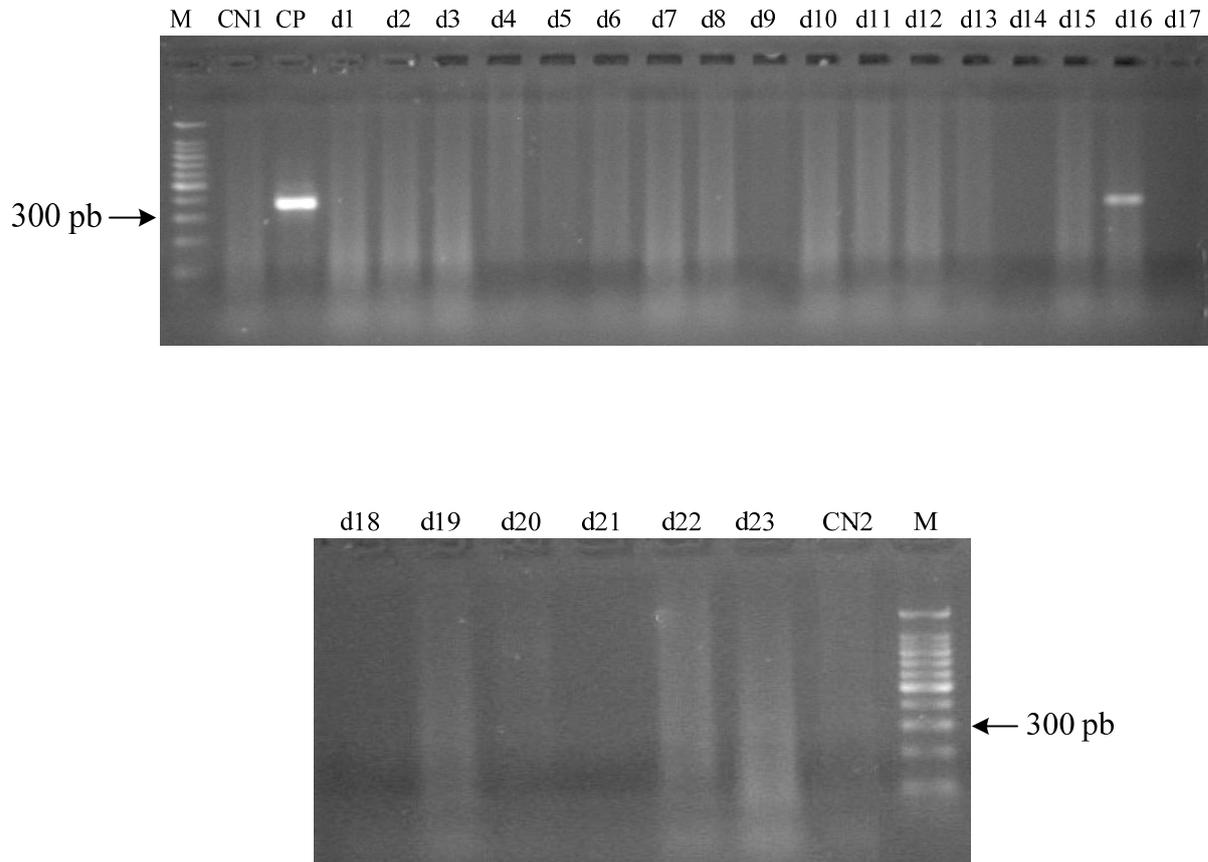


Figura 39: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

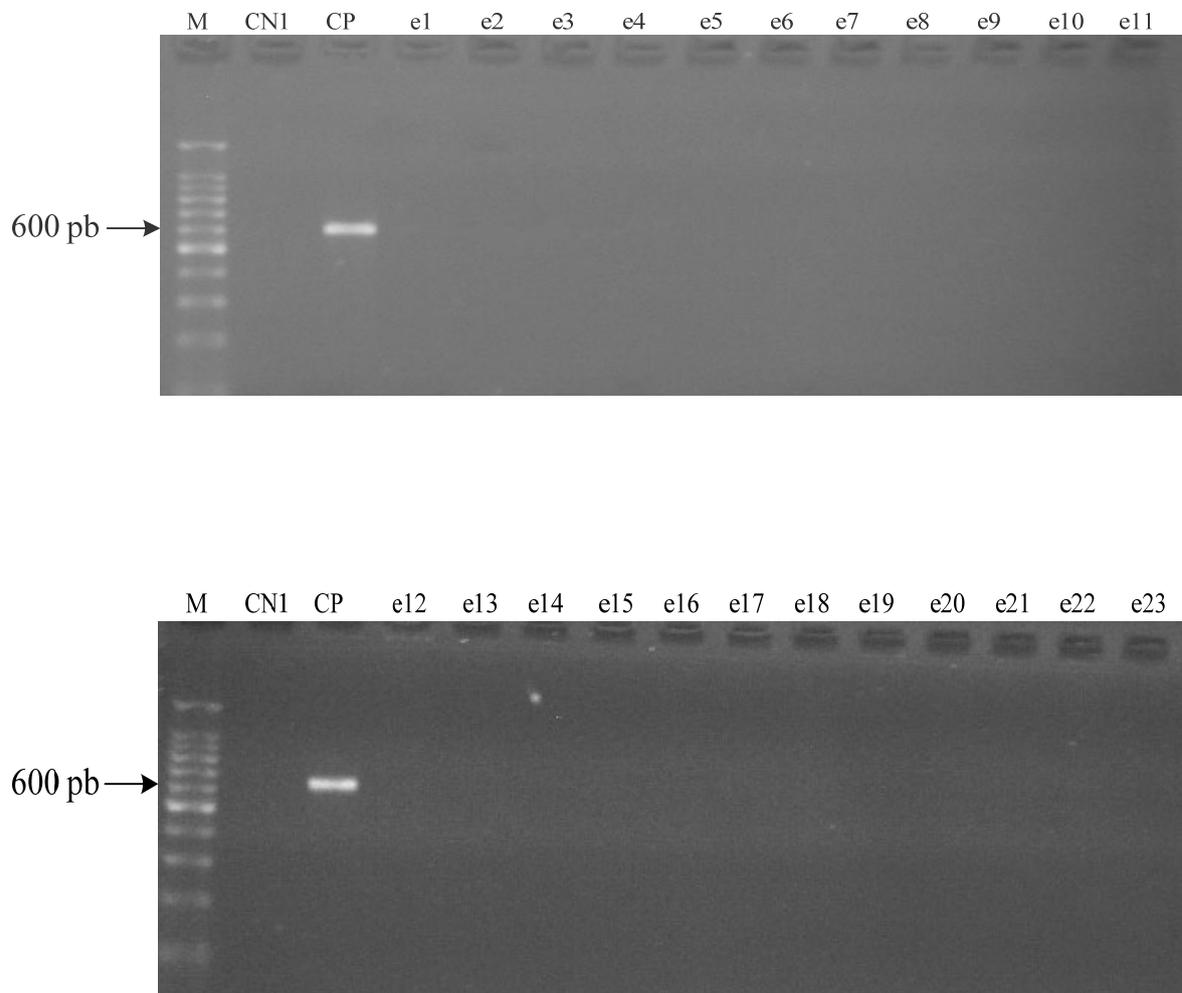


Figura 40: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta 603 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

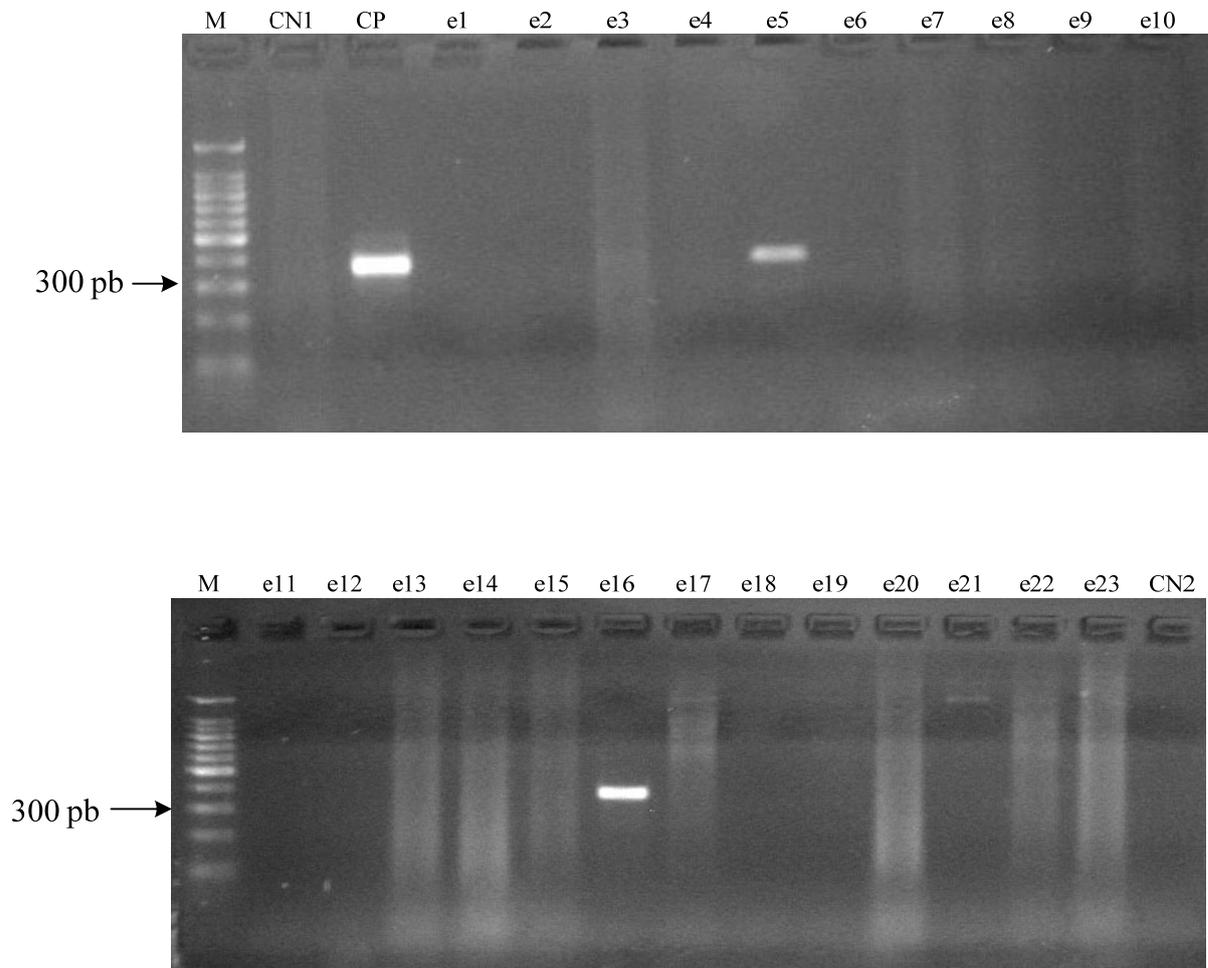


Figura 41: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método LnPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta 353 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

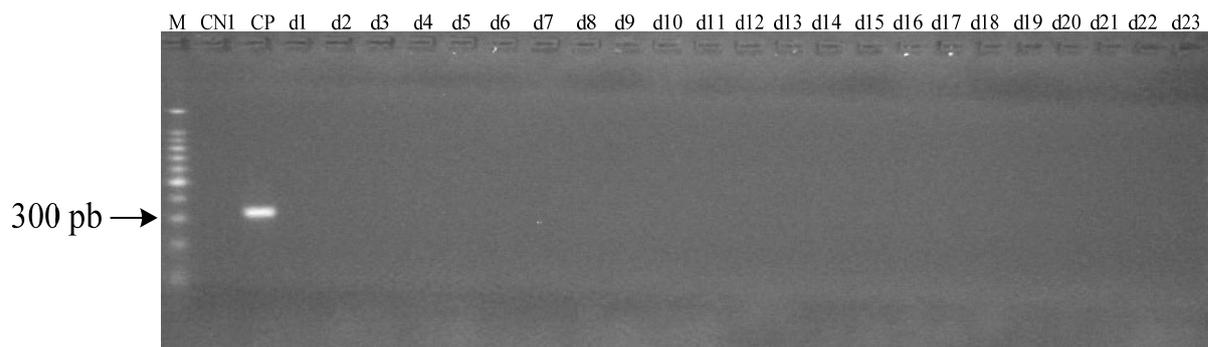


Figura 42: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

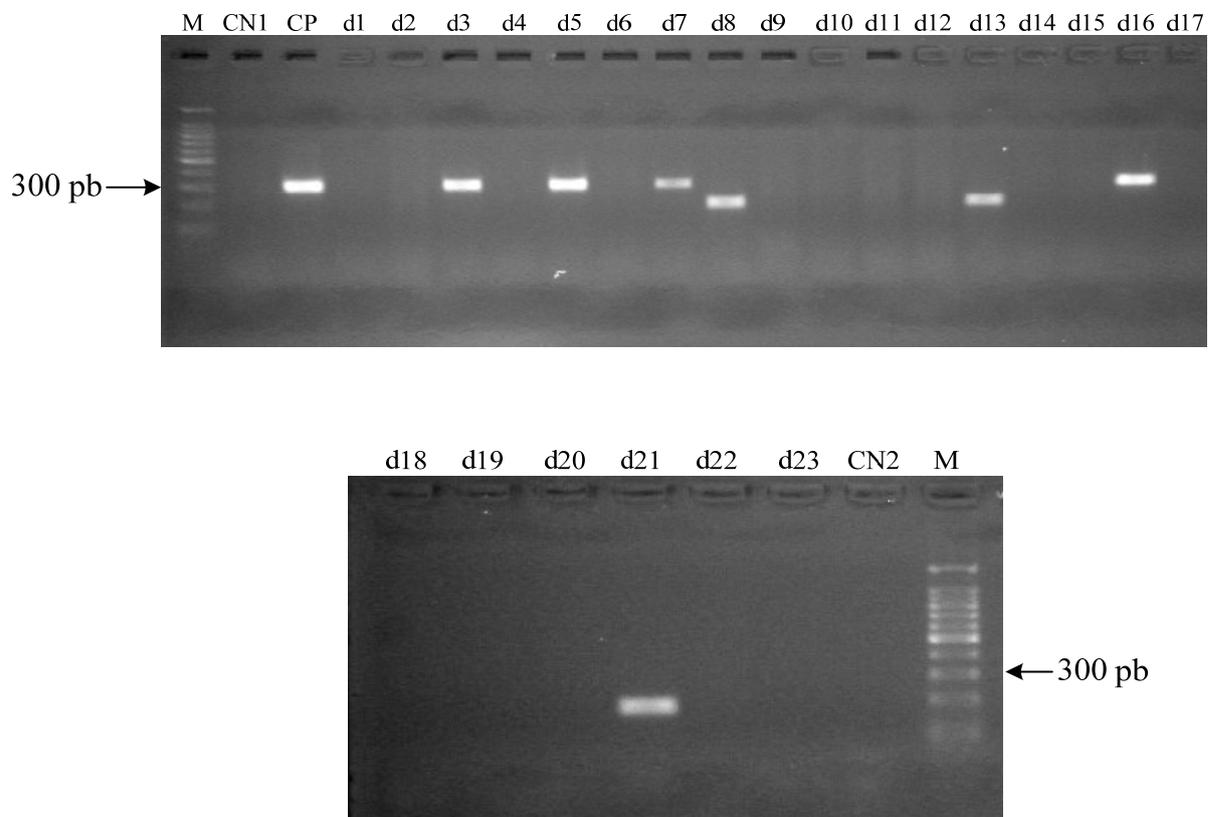


Figura 43: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular direita dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta de 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **d1 - d23:** amostras de cães.

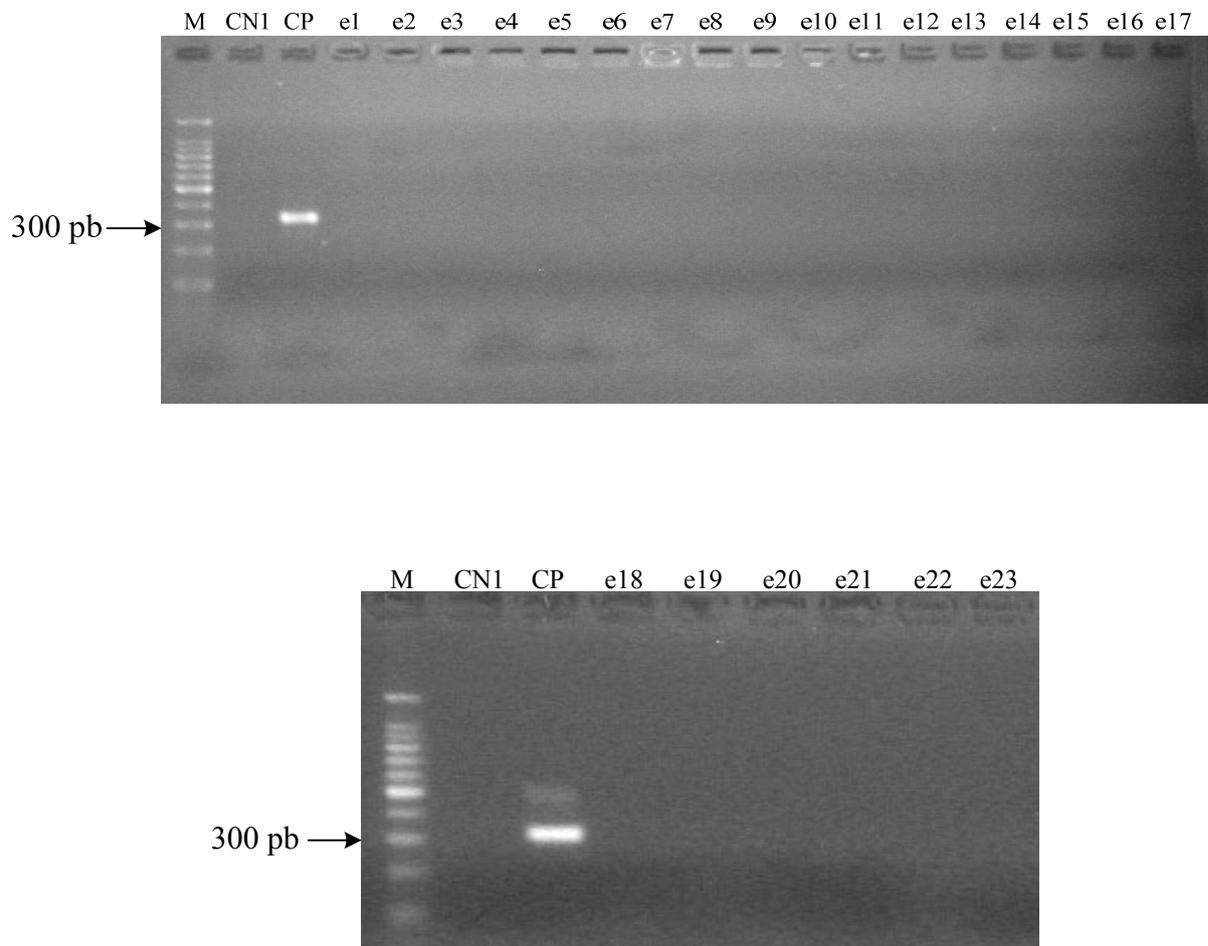


Figura 44: Gel de agarose 2% dos produtos da 1ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta de 300 a 350 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

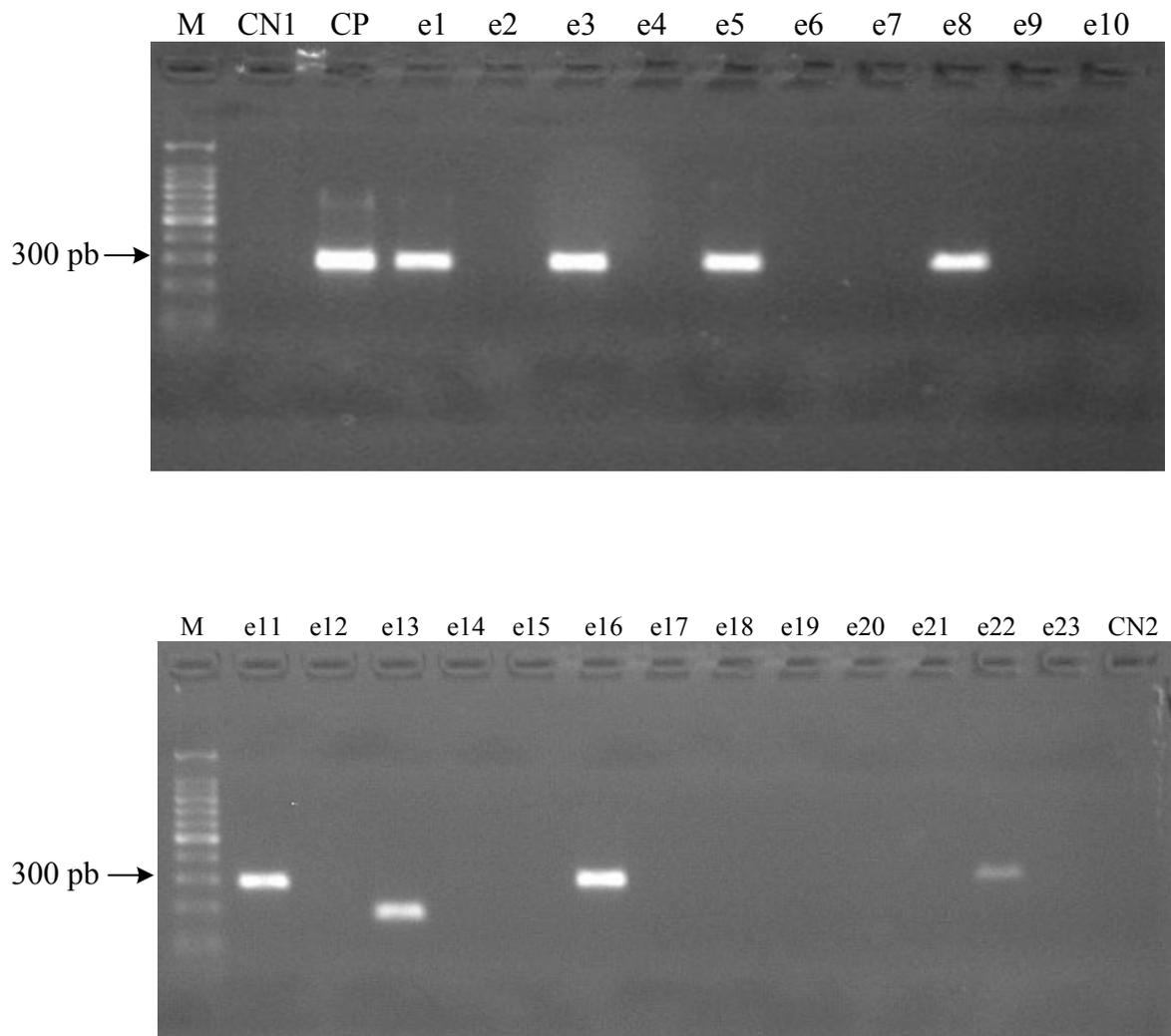


Figura 45: Gel de agarose 2% dos produtos da 2ª reação de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR referentes aos *swabs* conjuntivais da ocular esquerda dos cães do grupo 2.

Produto amplificado apresenta de 280 a 330 pb. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN1:** controle negativo sem DNA para a 1ª reação. **CN2:** controle negativo sem DNA para a 2ª reação. **CP:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **e1 - e23:** amostras de cães.

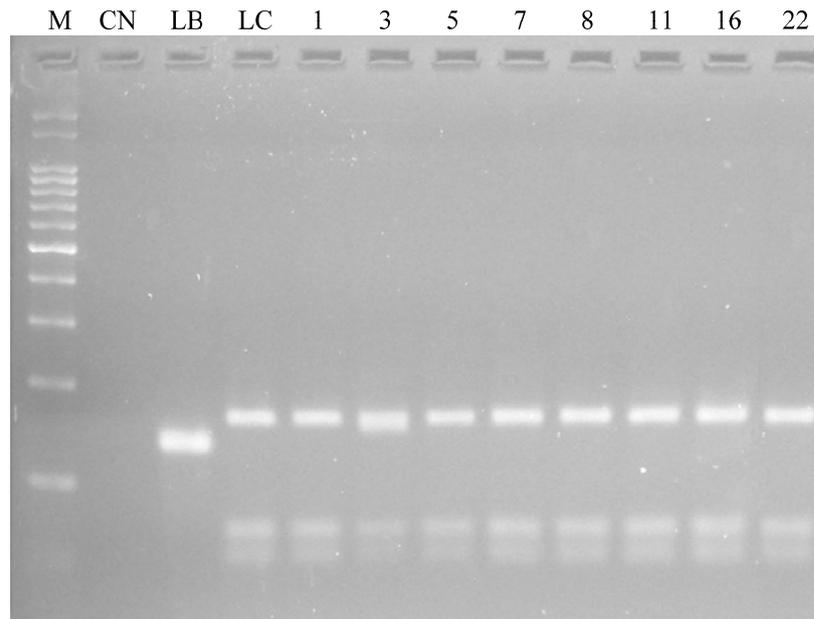


Figura 46: Gel de agarose 2% da análise por RFLP dos produtos de PCR obtidos pelo método ITS1 nPCR das amostras dos cães do grupo 2.

Resultado obtido pela digestão dos produtos de PCR da 2ª reação do método ITS1 nPCR, das amostras dos cães do grupo 2, utilizando-se a enzima de restrição *Hae III*. **M:** padrão de peso molecular – 100 pb. **CN:** controle negativo sem DNA. **LB:** controle positivo para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). **LC:** controle positivo para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/1973/BH 46). **1 - 22:** amostras de cães positivos para a 2ª reação do método ITS1 nPCR.

Tabela 4: Resultados dos *swabs* conjuntivais dos cães do grupo 2 (DNA extraído por fervura)

		CÃES GRUPO 2 (FERVURA)																							Total de cães positivos	Total de amostras positivas*						
MÉTODO	ETAPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23								
		E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D							
kDNA - Hibridização	PCR	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	Hibr.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
kDNA snPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2ª reação	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LnPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2ª reação	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ITS1 nPCR	1ª reação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2ª reação	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

E : Ocular Esquerda
D : Ocular Direita
+ : Resultado Positivo
- : Resultado Negativo
* : considerando oculares esquerda e direita

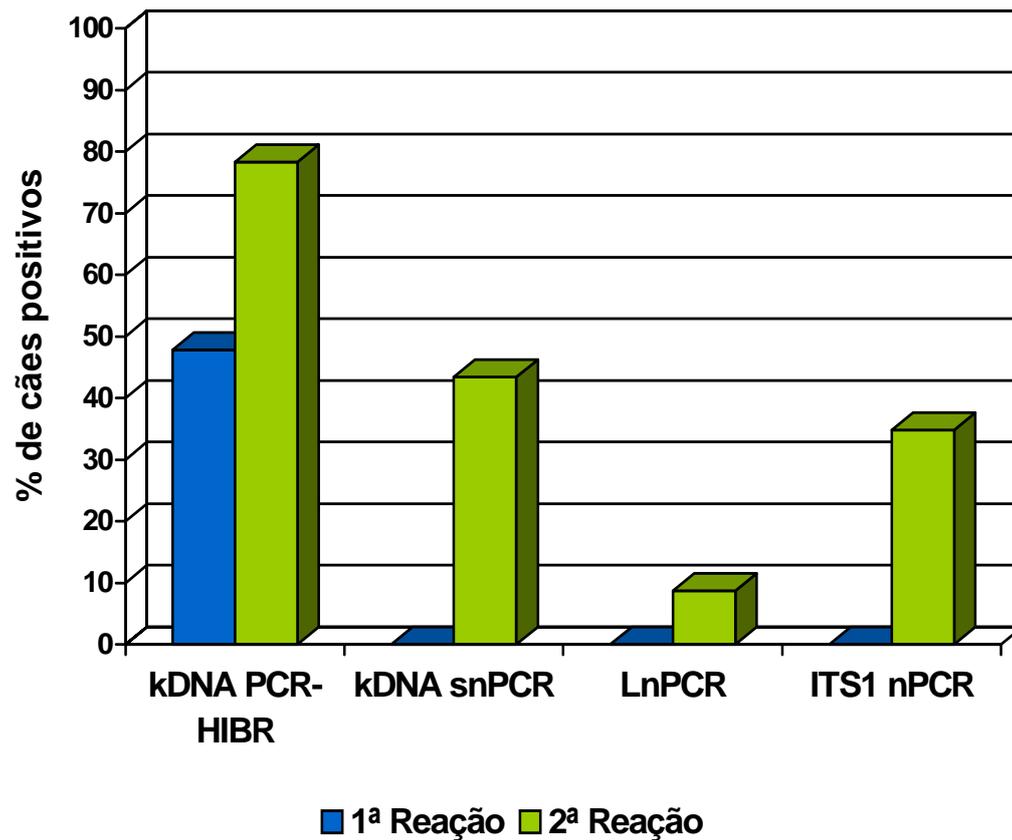


Figura 47: Porcentagem de cães positivos do grupo 2 (DNA extraído por fervura) na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.

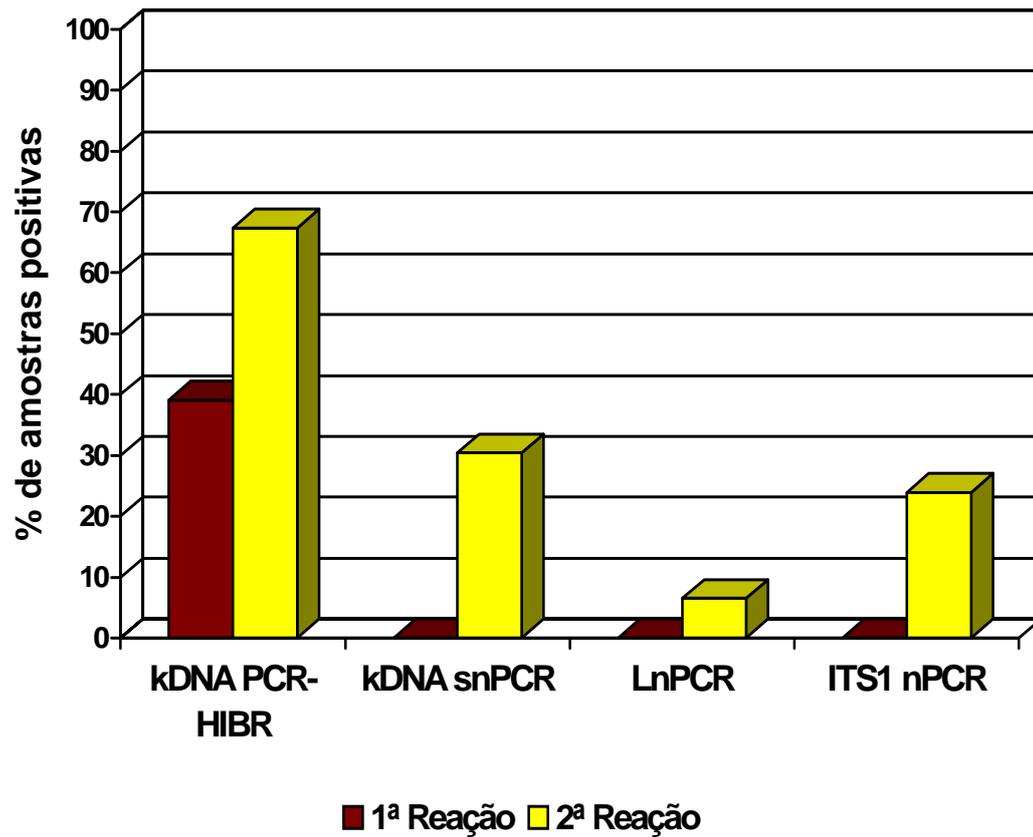


Figura 48: Porcentagem das amostras positivas das oculares esquerda e direita do grupo 2 (DNA extraído por fervura) na 1ª e 2ª reação obtida pelos métodos kDNA PCR-Hibridização, kDNA snPCR, LnPCR e ITS1 nPCR.

7) DISCUSSÃO

Entre os procedimentos de controle da leishmaniose visceral adotados pelo Ministério da Saúde estão os levantamentos rotineiros de infecção canina onde são utilizados os métodos sorológicos RIFI e ELISA. Estudos realizados em países onde a doença é endêmica têm mostrado que animais infectados, particularmente os assintomáticos, frequentemente permanecem soronegativos ou discretamente positivos (ASFHORD *et al.*, 1995; LACHAUD *et al.*, 2002; NEOGY *et al.*, 1992). Além desse inconveniente existem dificuldades relacionadas com a interpretação de resultados devido a reações cruzadas (VEXENAT *et al.*, 1996) e por uma possível demora entre a infecção e soroconversão (DYE *et al.*, 1993). De modo geral a sorologia parece não ser um bom indicador da infecção (ASFHORD *et al.*, 1995), pois a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos podem variar consideravelmente, subestimando a incidência da doença.

Os métodos de PCR utilizados para detecção de *Leishmania* permitem determinar a presença do DNA do parasita em várias amostras biológicas, identificar as infecções por *Leishmania* em casos ativos da doença, monitorar pacientes após quimioterapia e também detectar infecções em hospedeiros vertebrados ou flebótomos em estudos epidemiológicos (SINGH, 1997).

Muitos estudos têm mostrado a PCR como uma boa alternativa para o diagnóstico da LVC por sua alta sensibilidade e especificidade.

Moreira *et al.* (2007) compararam a eficácia de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares em diagnosticar cães com diferentes sinais clínicos. Os resultados obtidos das amostras de aspirados de linfonodo pela PCR apresentaram sensibilidades de 100% para cães sintomáticos, 96% para oligossintomáticos e 95,5% para assintomáticos. De acordo com os resultados a PCR demonstrou ser a mais sensível das técnicas analisadas, indicando ser este método muito eficiente para o diagnóstico da leishmaniose canina.

Asfhord *et al.* (1995) analisaram amostras de aspirados de medula óssea e plasma de cães e compararam a sensibilidade e especificidade dos métodos de PCR, FAST-ELISA, cultura e inoculação em hamsters. A comparação realizada entre PCR e FAST-ELISA mostrou que a sensibilidade da detecção sorológica foi de 63% e a especificidade foi de 68%, enquanto que para a PCR ambas foram de 100%. Na correlação da PCR com a cultura e inoculação em hamster além dos resultados positivos em ambos, 41% dos que foram negativos para cultura ou inoculação foram positivos para PCR. Pelos resultados obtidos concluíram que a PCR é o melhor método disponível para detectar a infecção e questionam o uso da sorologia como ferramenta para determinar infecção por *Leishmania* em cães.

A maioria dos estudos realizados tem comparado a PCR com métodos convencionais de diagnóstico, porém poucos foram realizados comparando as diversas técnicas de PCR disponíveis. Existe uma necessidade em padronizar as técnicas de PCR para que possam ser utilizadas para o diagnóstico.

Este estudo compara a sensibilidade de quatro métodos de PCR, partindo de um volume de 1,0 µL de amostra de DNA. As amostras foram coletadas das conjuntivas de cães sintomáticos e soropositivos, utilizando *swabs* estéreis para o esfregaço. O método do *swab* conjuntival apresenta como vantagens: ser não invasivo, livre de estresse e poder ser repetido com facilidade. A eficácia do *swab* no procedimento de coleta foi previamente estudada por alguns pesquisadores. Strauss-Ayali *et al.* (2004) utilizaram amostras de *swabs* conjuntivais para identificação de *L. infantum* em cães sintomáticos, sendo estas analisadas por ITS1 PCR e comparadas com testes sorológicos e cultura. Em seus resultados a sensibilidade e a especificidade da PCR conjuntival foi de 92% e 100% respectivamente, mostrando ser superior aos resultados da PCR de aspirados de linfonodo e baço (86%) e da cultura (74%). Ferreira *et al.* (2008) comparou amostras coletadas por *swab* das conjuntivas de cães sintomáticos com amostras de sangue, ambas não invasivas. As amostras foram analisadas utilizando o método de PCR seguido de hibridização. Os resultados obtidos mostraram que a positividade das amostras coletadas das conjuntivas através do *swab* conjuntival (91,3%) foi superior a obtida com amostras de sangue.

Neste trabalho antes da análise das amostras de cães os métodos foram testados com diluições seriadas de DNA isolado de culturas de promastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. O DNA foi extraído por fenol-clorofórmio.

Para *L. (L.) chagasi* os métodos que utilizam como alvo o kDNA foram os mais sensíveis, pois cada parasita possui aproximadamente 10.000 minicírculos de kDNA (BARKER, 1980), enquanto que os alvos SSU rRNA e ITS1 apresentam menos de 200 cópias por célula (VILLALBA; RAMIREZ, 1982). Baseado nos resultados apresentados na TAB. 1 a primeira etapa dos métodos kDNA PCR-Hibridização e do kDNA snPCR foram respectivamente 100 e 10 vezes mais sensíveis para mesma etapa dos métodos que utilizam como alvo genes do RNA ribossomal. O kDNA PCR-Hibridização apresentou melhor desempenho sobre o kDNA snPCR na primeira amplificação. Isso provavelmente se deve a habilidade dos iniciadores endereçados para a região conservada dos minicírculos em amplificar um grande espectro de classes de minicírculos, dado que é encontrada somente

uma classe de minicírculo nos produtos de kDNA snPCR (MORALES, *et al.*, 2002). Um estudo anterior mostrou que os iniciadores para a região conservada dos minicírculos de kDNA foram 10 vezes mais sensíveis do que os endereçados para a região variável (RODGERS, M.R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D.F., 1990).

Na segunda etapa o método que apresentou melhor desempenho foi o kDNA snPCR superando os demais métodos em 10 vezes, isso porque a segunda amplificação permitiu um aumento na sensibilidade de 1000 vezes enquanto que na hibridização o aumento foi de 10 vezes (TAB. 1). Nesta etapa o kDNA snPCR conseguiu detectar até 10 fg de DNA que corresponde a 0,1 parasito e os demais foram capazes em detectar até 1 parasito (100 fg de DNA). Lachaud *et al.* (2002) compararam seis métodos de PCR utilizando iniciadores endereçados para o kDNA e para o DNA genômico. Antes de analisar as amostras clínicas de cães, testaram os métodos de PCR com amostras de cultura. Os resultados mostraram que todos os métodos foram capazes de detectar menos de um parasita por tubo.

Na análise da diluição seriada de DNA de *L. (V.) braziliensis* verificou-se que na primeira etapa os métodos apresentaram os mesmos resultados obtidos para *L. (L.) chagasi*. A grande exceção foi o método de kDNA snPCR que não foi capaz de amplificar nenhuma das concentrações de DNA, indicando ser esse método inadequado para detecção de *L. (V.) braziliensis*.

Da mesma maneira que ocorreu para *L. (L.) chagasi* a segunda etapa proporcionou um aumento na sensibilidade dos três métodos que obtiveram resultados positivos para *L. (V.) braziliensis*. Aqui o aumento causado pela hibridização também foi de 10 vezes em relação à PCR. A segunda amplificação da LnPCR permitiu um aumento de 1000 vezes e no ITS1 nPCR o aumento foi de 10.000 vezes (TAB. 2). Nesta etapa a grande surpresa foi o método ITS1 nPCR, que demonstrou ser 10 vezes mais sensível dos demais métodos.

Dos métodos que foram mais adequados para detectar DNA de *L. (V.) braziliensis*, o LnPCR e o kDNA PCR – Hibridização foram capazes de detectar na segunda etapa até um parasita e o método ITS1 nPCR conseguiu detectar até 0,1 parasita por tubo de reação.

As amostras clínicas utilizadas nesse estudo foram coletadas das conjuntivas de cães sintomáticos e soropositivos nos testes de RIFI, ELISA e fixação de complemento. Na coleta foi utilizado um *swab* estéril para o esfregaço das duas conjuntivas de todos os cães. Os cães foram divididos em dois grupos, sendo que no grupo 1 o DNA foi extraído do *swab* pelo método de fenol-clorofórmio e no grupo 2 por fervura.

Os resultados das amostras obtidas dos cães do grupo 1 (TAB. 3) mostraram que os métodos kDNA PCR-Hibridização e kDNA snPCR apresentaram sensibilidades semelhantes, ambas significativamente maiores que as dos métodos ITS1 nPCR e LnPCR. O método kDNA PCR-Hibridização tem a vantagem de possibilitar a identificação dos subgêneros de *Leishmania* pelo uso de sondas específicas na etapa da hibridização. Na etapa da amplificação é produzido um produto de 120 pb para todas as espécies de *Leishmania*. As sondas subgênero específicas permitem a diferenciação entre *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*, que também tem sido encontrada infectando cães, embora raramente (ANDRADE *et al.*, 2006). O kDNA snPCR apresenta como desvantagem a impossibilidade do seu conjunto de iniciadores de amplificar o DNA de *L. (V.) braziliensis*, conforme visto nos resultados obtidos para diluição seriada do DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (TAB. 2).

Outros pesquisadores também verificaram que o kDNA como alvo para amplificação rendeu bons resultados. No estudo realizado por Lachaud *et al.* (2002) foram comparados seis métodos de PCR utilizando amostras de sangue periférico de cães para detectar LVC. Três dos métodos utilizaram iniciadores endereçados para o DNA genômico e os outros três para o kDNA. Os métodos que demonstraram melhor desempenho utilizaram kDNA como alvo, sendo esses capazes de detectar parasitas em 100% dos cães soropositivos sintomáticos e assintomáticos.

Bensoussan *et al.* (2006) compararam três métodos de PCR para diagnosticar Leishmaniose cutânea (LC) utilizando amostras coletadas de nódulos e bordas de úlceras. Para validar as técnicas de PCR essas foram comparadas com cultura de promastigotas e microscopia. Dos métodos de PCR utilizados o kDNA PCR apresentou maior sensibilidade diagnosticando 98,7% dos pacientes com LC, seguido pelo ITS 1 PCR com 91,0%. O método mini-exon PCR demonstrou ser pouco sensível, até mesmo quando comparado com a microscopia e a cultura de parasitas.

Nasereddin *et al.* (2006) em seu trabalho avaliou a sensibilidade e a especificidade dos métodos de kDNA-PCR, ITS1 PCR, mITS1 PCR e ELISA para diagnosticar LVC utilizando amostras de sangue de cães. Os resultados mostraram que o método kDNA PCR foi o mais sensível, seguido pelo mITS1 PCR, ELISA e ITS1 PCR.

Os métodos ITS1 nPCR e o LnPCR mostraram sensibilidades similares. Este resultado é consistente levando-se em conta que ambos apresentam número similar de alvos por célula. A vantagem do método ITS1 nPCR é que este permite a identificação das espécies após digestão dos produtos de PCR pelo método de RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII*.

Estudos anteriores mostram que a *HaeIII* consegue distinguir todas as espécies de *Leishmania* de importância médica (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; NASEREDDIN *et al.*, 2006; SCHÖNIAN *et al.*, 2003). O procedimento PCR-RFLP apresenta grande utilidade em áreas onde mais de uma espécie é endêmica e também em áreas não endêmicas onde infecções importadas possam ocorrer. Neste estudo todas as amostras positivas para ITS1 nPCR foram identificadas como *L. (L.) chagasi*. A LnPCR é uma técnica gênero específica.

Os resultados do grupo 2 nos quais o DNA foi extraído do *swabs* por fervura (TAB. 4) foram menos consistentes. Todos os métodos apresentaram menor desempenho em relação ao grupo 1.

O kDNA PCR-Hibridização apresentou os melhores resultados identificando 78,3% dos cães infectados e 67,4% das amostras (considerando oculares esquerda e direita). Todos os outros métodos apresentaram sensibilidades inferiores principalmente o LnPCR e o kDNA snPCR. Esses métodos, que apresentam produtos de amplificação maiores (603 pb para LnPCR e 800 pb para kDNA snPCR), obtiveram poucos resultados positivos provavelmente devido a ocorrência de degradação de DNA durante a extração e armazenamento. Os métodos com produtos de PCR maiores são mais sensíveis aos efeitos da degradação devido a maior chance estatística da fragmentação ocorrer no interior destes segmentos. Meredith *et al.* (1993), utilizou flebótomos infectados por *Leishmania* submetendo-os a PCR utilizando iniciadores endereçados para o kDNA e para a região ribossomal. Parte do material foi armazenada a -20°C e após dois anos foram testados com os mesmos iniciadores. Os resultados positivos foram obtidos apenas para os iniciadores de kDNA. O autor atribuiu este resultado a uma possível degradação do DNA, impedindo assim a amplificação do fragmento de 650 pb do DNA ribossomal.

Da mesma forma que ocorreu para o grupo 1, todas as amostras positivas para ITS1 nPCR foram identificadas como *L. (L.) chagasi*. Trinta por cento das amostras, escolhidas aleatoriamente, foram analisadas novamente e a reprodutibilidade foi somente de 79% neste grupo comparado com 94% para o grupo 1. O método de extração de DNA por fervura produziu amostras de menor qualidade, provavelmente devido ao DNA não ter sido purificado. Nesse procedimento o material eluído do *swab* foi centrifugado e o sobrenadante utilizado na PCR. Potenciais contaminantes solúveis e inibidores não foram removidos. Embora a extração por fervura seja muito simples, rápida e barata, nossos resultados mostram que o método de fenol-clorofórmio é o método mais indicado para a extração de DNA a partir de *swabs*. Isso também foi constatado no trabalho de Ferreira *et al.* (2008) que comparou os

métodos de extração de DNA de fenol-clorofórmio e fervura em amostras coletadas de cães por *swab* conjuntival. No experimento as amostras foram analisadas utilizando o método de PCR com alvo na região conservada dos minicírculos do cinetoplasto seguida de hibridização, com sondas de *L. chagasi* marcadas com P³². Os resultados obtidos mostraram que o método de extração de DNA por fenol-clorofórmio apresentou os melhores resultados.

A elevada sensibilidade dos métodos que apresentam como alvo os minicírculos do kDNA, reportado por outros pesquisadores (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; LACHAUD *et al.*, 2002), foi confirmada neste estudo. O kDNA PCR-Hibridização parece ser a melhor escolha dentre os métodos avaliados, por ter sido sensível e capaz de diferenciar *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. A hibridização aumentou a sensibilidade e garantiu a especificidade evitando que bandas espúrias fossem incorretamente registradas. Este método também evita procedimentos com duas amplificações sucessivas (*nested* ou *semi nested*) que aumentam a probabilidade de contaminação por *amplicons*. Neste método, entretanto é necessária a utilização de material radioativo o que exige instalações especiais. Devido a sua alta sensibilidade o kDNA snPCR é também uma alternativa atraente em áreas onde *L. (V.) braziliensis* é ausente. O ITS1 nPCR, embora menos sensível permite a identificação das espécies. Este método é uma alternativa para laboratórios que não desejam trabalhar com material radioativo. Para o método ITS1 nPCR um aumento no volume das amostras de DNA poderia melhorar sua sensibilidade. Nós temos que considerar que as sensibilidades de todos os métodos de PCR utilizados neste estudo podem ser melhoradas, pois somente 1,0 µL de amostra de DNA foi utilizada e este volume pode ser aumentado pelo menos até 10,0 µL.

Nossos resultados apóiam a aplicabilidade do método do *swab* conjuntival para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Este método associado à extração de DNA por fenol-clorofórmio e aos métodos de PCR mais sensíveis mostrou sensibilidades superiores a 90%, ficando na mesma faixa registrada para a PCR de amostras obtidas por métodos invasivos (ANDRADE *et al.* 2006; MANNA *et al.*, 2004; REALE *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

O *swab* conjuntival pode ser uma valiosa ferramenta para o diagnóstico da LVC, principalmente em circunstâncias onde os testes sorológicos não sejam adequados, como por exemplo, no diagnóstico e acompanhamento de cães vacinados contra a leishmaniose, que depois da vacinação podem apresentar resultado positivo nos testes sorológicos convencionais.

8) CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram às seguintes conclusões:

1. Na análise da diluição seriada do DNA isolado de promastigotas de *L.(L.) chagasi*, obtidos por meio de cultura, o kDNA snPCR foi o método mais sensível sendo capaz de detectar até 10 fg (0,1 parasita), enquanto os outros métodos detectaram até 100 fg (1,0 parasita).
2. Na análise da diluição seriada do DNA isolado de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, obtidos por meio de cultura, o método ITS1 nPCR foi o mais sensível detectando até 10 fg (0,1 parasita), enquanto o LnPCR e o kDNA PCR-Hibridização detectaram até 100 fg (1,0 parasita).
3. Em DNA purificado de promastigotas o método ITS1 nPCR foi mais sensível para *L.(V.) braziliensis* do que para *L.(L.) chagasi*.
4. O método kDNA snPCR não é um método adequado para a detecção de *L.(V.) braziliensis*.
5. A hibridização aumentou em 10 vezes a sensibilidade do kDNA PCR-Hibridização e a segunda amplificação em 1000 vezes a sensibilidade dos métodos *nested* ou *semi nested* para DNA purificado de *L.(L.) chagasi*.
6. A hibridização aumentou em 10 vezes a sensibilidade do kDNA PCR-Hibridização e a segunda amplificação 1000 vezes a sensibilidade do LnPCR e 10.000 vezes a do ITS1 nPCR, em DNA purificado de *L.(V.) braziliensis*.
7. Os resultados obtidos com DNA purificado de promastigotas cultivados não se correlacionaram bem com os obtidos através do *swab* conjuntival.
8. O método de extração de DNA por fenol-clorofórmio apresentou os melhores resultados para o diagnóstico da LVC em amostras coletadas pelo método do *swab* conjuntival.

9. No grupo de cães onde o DNA foi extraído dos *swabs* conjuntivais por fenol-clorofórmio, os métodos que apresentaram melhor desempenho foram os baseados em minicírculos de kDNA: kDNA PCR-Hibridização e kDNA snPCR.
10. A extração de DNA por fervura não demonstrou resultados consistentes, provavelmente porque o DNA não passou por processo de purificação.
11. Os métodos LnPCR e kDNA snPCR apresentaram baixa positividade no grupo onde o DNA foi extraído dos *swabs* por fervura. Provavelmente ocorreu degradação durante o processo de extração ou armazenamento afetando mais intensamente estes métodos, que por possuírem produtos de PCR maiores (603 pb para LnPCR e 800 pb para kDNA snPCR) apresentam também maior chance estatística da fragmentação ocorrer em seus alvos.
12. O método kDNA PCR-Hibridização parece ser a melhor escolha dentre os métodos avaliados por apresentar alta sensibilidade, distinguir *L. (L.) chagasi* de *L. (V.) braziliensis* e evitar processos que utilizam duas amplificações (mais propensos a contaminação). Este método obteve os melhores resultados tanto no grupo de cães onde o DNA foi extraído por fenol-clorofórmio quanto no grupo extraído por fervura.
13. A escolha do melhor método, entretanto, depende do tipo de informação requerida, da origem da amostra e das condições do laboratório.
14. Os resultados apresentados neste estudo apóiam a aplicabilidade do método do *swab* conjuntival para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Este método associado à extração de DNA por fenol-clorofórmio e aos métodos de PCR mais sensíveis, mostrou sensibilidades superiores a 90%.

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P., *et al.* Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, v. 77, p. 557-561, 1991.
- ADAM, W., *et al.* Photobiological studies with dioxetanes in isolated DNA, bacteria, and mammalian cells. **Environ. Health Perspect.**, v. 88, p. 89-97, 1990.
- ALVAR, J., *et al.* Canine leishmaniosis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p. 371-378, 1994.
- ALVAR, J., *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ANDRADE, A.S.R. *et al.* Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop.**, v. 78, p. 261-267, 2001.
- ANDRADE, H.M. *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol.** v. 140, p. 231-238, 2006.
- ARANSAY, A.M.; SCOLULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied Environmental Microbiology.** v. 66, p. 1933-1938, 2000.
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infec.Dis.**, v. 2, n.2, p. 145-146, 1996.
- ASHFORD, D A. *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 8, p. 251-255, 1995.
- ASHFORD, D. A. *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 53-57, 1998.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BADARÓ, R. Current situation for leishmaniasis in Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CONTROL STRATEGIES FOR LEISHMANIASIS.1987, Boca Raton. **Proceedings...** Boca Raton, FL: CRC Press, 1987. p. B1-5.
- BADARÓ, R. REED, S. G. CARVALHO, E.M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis, sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 32, p. 480-484, 1981.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis – a diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, p. 14-15, 2008.
- BARBOSA-DE-DEUS, R. *et al.* *Leishmania major* – like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9, n.6, p. 1361-1366, 2002.

- BARKER, D. C. The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electron microscopy images of isolated, purified networks. **Micron.**, v. 11, p. 21-62, 1980.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotas by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BATES, P.A.; ASHFORD, R.W. Old world leishmaniasis. In: COX, F.E.G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S.H.; DESPOMMIER, D.D. (Eds.), Topley & Wilson's microbiology & Microbial Infections, 10 nd ed. **Parasitology**. London, Hodder Arnold, 2006. p. 283-312.
- BATES, P.A., ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BENSOUSSAN, E. *et al.* Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1435-9, 2006.
- BERRAHAL, F. *et al.* Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 273-277, 1996.
- BORJA-CABRERA, G.P. *et al.* Immunogenicity assay of Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**. v. 26, p. 4991-4997, 2008.
- BOZZA, M. *et al.* Characterization of "old world" *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 1-2, 1995.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F., *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cad Saúde Pública**. v. 17, p. 1263-7, 2001.
- CIAMARELLA, P., *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 1, p. 539-543, 1997.
- CORTES, S. *et al.* PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, p. 12-17, 2004.
- COSTA, C.A. *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.
- COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 223-228, 2001.
- COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 415-419, 2007.

- COURTENAY, O. *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Inf. Dis.**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.
- COUTINHO, S.G. *et al.* A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 80, p. 17-22, 1985.
- CRUZ, I. *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, supl. 1, p. S185-S189, 2002.
- CUPOLILLO, E., *et al.* Intergenic region typing (ITR): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 73, p. 145-155, 1995.
- DAMS, E., *et al.* Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Res.** v. 16, p. 87-173, 1988.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 151-156, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from the urban area of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 54-60, 2006.
- DAR, L.; KHAN, B.K. The role of in-vitro Isotopic Techniques in Molecular Biology. **World J. Nucl. Med.**, v. 3, p. 72-81, 2004.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares da importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani*, em área endêmica do calazar, no Ceará. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v. 48, p. 79-98, 1955.
- DEGRAVE, W. *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.
- DESJEUX, P.H. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v.14, p. 417-423, 1996.
- DESJEUX, P.H. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.
- DYE, C. The logic of Visceral Leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 125-130, 1996.
- DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiol. Infect.**, v. 103, p. 647-656, 1993.

- EL TAI, N. *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spaced (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. **Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 94, p. 1-5, 2000.
- EPE, B., *et al.* Photochemical DNA modifications induced by 1,2-dioxetanes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 85, p. 265-281, 1992.
- EVANS, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania***. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 45, 1989.
- FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, p. 71-80, 2004.
- FERNANDES, O., *et al.* An Oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 279-284, 1996.
- FERNANDES, O. *et al.* Mini-exon variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 66, p. 261-277, 1994.
- FERREIRA, E.C., *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.**, v. 146, p. 235-241, 2007.
- FERREIRA, S.A. *et al.* Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridização in Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.152 (3-4), p. 257-263, 2008.
- FRANÇA-SILVA, J.C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic área of Montes Claros municipally, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.
- GOMES, Y. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet. J.**, v. 175, p. 45-52, 2008.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2.,2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla: [s.n.], 2002, p. 7-14.
- GRAMICCIA, M., GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.
- GRIMALDI, G., TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 229-243, 2001.

- HARITH, A. E. *et al.* Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 603-606, 1987.
- HARITH, A. *et al.* Application of a direct agglutination test for detection of specific-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2252-2257, 1989.
- HARRIS, E. *et al.* Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 1989 – 1995, 1998.
- HEADINGTON, C. E. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 96, (S1), p. 195-197, 2002.
- HERNANDEZ, R., *et al.* Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA codon region: comparison with other trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 41, p. 207-212, 1990.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.** v. 22, p. 439-445, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 279-289, 1999.
- KOUTINAS, A.F. *et al.* A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** v. 98, p. 247-261, 2001.
- LACHAUD, L. *et al.* Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of Visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 236-240, 2000.
- LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 210-215, 2002.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. v. 1. London, Academic Press, 1987. p. 1-120.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world leishmaniasis. In: COX, F.E.G., WAKELIN, D., GILLESPIE, S.H., DESPOMMIER, D.D. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, 10 nd ed. **Parasitology**. London, Hodder Arnold, 2006, p. 313-349.
- LANE, R.P. Sandflies (Phlebotominae). In: LANE, R.P., CROSSKEY, R.W. (Eds.), **Medical Insects and Arachnids**. London, Chapman and Hall, 1993, p. 78-119.

- LEON, W.; FOUTS, D.L.; MANNING, J. Sequence arrangement of the 16S e 26S rRNA gene in pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. **Nucleic Acids Res.** v. 5, p. 491-504, 1978.
- LODGE, R.; DIALLO, T.O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1922–1931, 2006.
- LOOKER, D., *et al.* Primary structure of *Leishmania donovani* small subunit ribosomal RNA coding region. **Nucleic Acids Res.** v. 16, p. 7198, 1988.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028, 2008.
- MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 82, p. 566- 567, 1988.
- MANCIATI, F.; TARDONI, S.; MELOSI, M. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. **Parasitologia**, v. 44, p. 99, 2002.
- MANNA, L. *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.
- MARFURT, J. *et al.* Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, p. 3147-3153, 2003.
- MEREDITH, S. E. O. *et al.* Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Arch. Inst. Pasteur Tunis**, v. 70, p. 419-431, 1993.
- MEREDITH, S. *et al.* Leish-KIT, a stable direct agglutination test base don freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, p. 1742-1745, 1995.
- MIFFLIN, T.E., *et al.* Comparison of radioactive (³²P and ³⁵S) and biotinylated probes for detection of cytomegalovirus DNA. **Clin. Biochem.**, v. 20, p. 231-235, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p- (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>> Acesso em 07 set. 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral – Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Disponível em: <<http://www.dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo>> Acesso em 26 out. 2007.

- MOLINA, R., *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. Royal Soc. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491-493, 1994.
- MOLDEN, D.P., *et al.* Comparison of radio-labeled DNA probe with a nonisotopic probe for assay of serum hepatitis B virus DNA. **Clin. Physiol. Biochem.**, v. 3, p. 174-183, 1985.
- MORALES, A. M., *et al.* Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1533-1537, 2002.
- MOREIRA, M.A.B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 245-252, 2007.
- MORENO, J.; ALVAR. J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 399-405, 2002.
- NASEREDDIN, A. *et al.* Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J. Parasitol.** v. 92, p. 178 – 183, 2006.
- NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 495p.
- NEOGY, A. *et al.* Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 772-777, 1992.
- NOGUEIRA, S. *et al.* Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, p. 4805-4810, 2005.
- PALATNICK DE SOUZA, C. B. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.
- PARANHOS-SILVA, M. *et al.* A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 39-44, 1996.
- PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970- 974, 2008.
- QUINELL, R.J. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, p. 253-261, 2001.
- RAMIREZ, J. R. *et al.* Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3768-73, 2000.
- REALE, S. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2931-2935, 1999.

- REED, S.G. *et al.* An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 632-639, 1990.
- REITHINGER, R. *et al.* Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dogs blood and bone marrow. **J. Clin Microbiol.**, v. 38, p. 748-51, 2000.
- REITHINGER, R. *et al.* Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J. Clin Microbiol.**, v. 41, p. 1486-1493, 2003.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.
- RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*–host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 292–297, 2000.
- ROGERS, W. O.; WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 565-569, 1987.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.**, v. 71, p. 267-275, 1990.
- RODRIGUES, E.H.G. **Análise de seqüências de minicírculos do kDNA obtidos de amostras clínica (lesões ativas e cicatrizadas) de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco, Brasil.** 2006. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, Recife, 2006.
- ROGERS, W.O.; WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 565-569, 1987.
- SANTOS-GOMES, G. *et al.* Experimental canine leishmaniasis: Evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**. v. 87, p. 235-244, 2003.
- SALIBA, E.K., OUMEISH, Y.O. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 275-277, 1999.
- SCHALLIG, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; SILVA, E. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1015-1018, 2002a.
- SCHALLIG, H. *et al.* Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 1-8, 2002b.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 9944-9948, 1992.
- SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**, v. 47, p. 349-358, 2003.

- SILVA, E. S. *et al.* Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Gen. Mol. Res.**, v. 3, n. 2, p. 251-257, 2004.
- SILVA, R.S. *et al.* Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 896-898, 2001a.
- SILVA, O.S. *et al.* 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**, v. 19, p. 1082-1092, 2001.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.
- SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 311-330, 2006.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R.R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.** v. 49, p. 55-60, 2003.
- SMYTH, A. J. *et al.* Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p. 183-192, 1992.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p. 560-563, 2001.
- SPANAKOS, G. *et al.* Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. **Mol. Cell Probes.** v. 16, p. 415-420, 2002.
- STRAUSS-AYALI, D. *et al.* Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1729-33, 2004.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 951-958, 2002.
- TAVARES, A.C.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev. Mol. Diagn.** v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.
- TURNER, J.E. **Atoms, Radiation, and Radiation Protection.** 2 ed. New York: John Wiley, 1995. 557p.
- VALENTINE-THON, E.; STEINMANN, J.; ARNOLD, W. Detection of hepatitis B virus DNA in serum with nucleic acid probes labeled with ³²P, biotin, alkaline phosphatase or sulphone. **Mol. Cell Probes**, v. 5, p. 299-305, 1991.
- VAN EYS, G. J.J.M. *et al.* Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 51, p. 133-142, 1992.

VEXENAT, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 38, p. 177-185, 1996.

VILLALBA, E., RAMIREZ, J.L. Ribosomal DNA of *Leishmania braziliensis*: number of ribosomal copies and gene isolation. **J. Protozool.** v. 29, p. 438-444, 1982.

VITALE, F. *et al.* TaqMan – based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 139 – 143, 2004.

VOLPINI, A.C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**. v. 90, p. 31-37, 2004.

WEIGLE, K.A. *et al.* Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **Am J. Trop. Med Hyg**, v. 44, p. 260-71, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Contém informações institucionais, notícias técnicas, publicações, projetos e serviços. Disponível em <www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Acesso em 12/02/2008.

ANEXO A: Artigo aceito para publicação

ARTICLE IN PRESS

Research in Veterinary Science xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples

Marcia Maria Pilatti^a, Sidney de Almeida Ferreira^a, Maria Norma de Melo^b, Antero Silva Ribeiro de Andrade^{a,*}

^aCentro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Rua Professor Mário Werneck S/N, Cidade Universitária-Campus da UFMG, 31120-970 Belo Horizonte, MG, CEP, Brazil
^bUniversidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Departamento de Parasitologia, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 6 February 2009
Available online xxx

Keywords:
Canine visceral leishmaniasis
Polymerase chain reaction (PCR)
Diagnosis
Conjunctival swab

ABSTRACT

Four PCR assays for detection of *Leishmania* DNA in conjunctival swab samples were compared. All methods had two steps: a first amplification followed by hybridization or by a new amplification (nested or seminested). Two methods (kDNA PCR-hybridization and kDNA snPCR) used primers targeted to the minicircles of kinetoplast DNA (kDNA) and the other two methods to the coding (LnPCR) and intergenic noncoding regions (ITS-1 nPCR) of ribosomal rRNA genes. kDNA PCR-hybridization was positive for 22/23 dogs (95.6%) and for 40/46 samples (86.9%), considering the right and the left conjunctivas. kDNA snPCR was positive for 21/23 dogs (91.3%) and for 40/46 samples (86.9%). The ITS-1 nPCR and LnPCR were both able to detect the parasites in 17/23 dogs (73.9%) and 29/46 (63%) and 30/46 (65.2%) samples, respectively. The positivities of the kDNA based methods were significantly higher; however the choice of the best method will depend on the kind of information required with the diagnosis.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Visceral leishmaniasis (VL) in the New World is a zoonotic disease caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* (= *L. infantum*). Dogs are considered the main domestic reservoir of the parasite constituting part of the epidemiological cycle of human transmission. VL epidemiological control in Brazil involves the systematic treatment of human cases, insecticide spraying within domestic and peridomestic habitations and elimination of seropositive dogs (Tesh, 1995). Correct diagnosis is important to avoid the disease transmission or unnecessary culling of dogs.

PCR has been shown to be a specific method for the detection of *Leishmania* DNA in a variety of clinical samples and to be more sensitive than the classical procedures for canine VL diagnosis (Reithinger and Dujardin, 2007). In addition, PCR is an attractive alternative method to follow-up vaccinated dogs (a leishmanial vaccine for dogs was licensed in Brazil) since these animals would test positive in the conventional serological tests. However, non invasive samplings are desirable since they are simpler, painless and more easily allowed by the dog-owners. An interesting approach in this context is the conjunctival swab procedure, a new method for sample collection that uses a sterile swab for sampling the dog conjunctivas. This method was shown to be highly sensitive (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008).

A major concern in the development and implementation of PCR for *Leishmania* diagnosis is the lack of standardization. Many reports on PCR diagnosis of leishmaniasis have been published, but very few studies have compared different protocols (Reithinger and Dujardin, 2007). In this study, we compared the sensitivities of four PCR assays used for *Leishmania* identification and previously tested in clinical diagnosis and field studies. All PCR methods had two steps: a first amplification followed by hybridization or by a new amplification (nested or seminested). Two of the methods (kDNA PCR-hybridization and kDNA snPCR) used primers addressed to kinetoplast minicircles and the other two methods used primers to the coding (LnPCR) and intergenic noncoding regions (ITS-1 nPCR) of the ribosomal rRNA genes.

The comparison was performed using a serial dilution of DNA isolated from cultured promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MHOM/1973/BH46) and clinical samples obtained by the conjunctival swab procedure. Twenty three symptomatic (according to Mancianti et al. (1988)) mongrel dogs, designated to compulsory euthanasia were used. These selected dogs were positive for enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IFAT) and the complement fixation reaction (CFR). Exfoliative epithelial cells were collected from the right (R) and left (L) conjunctivas of each animal using sterile cotton swabs. DNA purification from cotton swabs samples was as described by Strauss-Ayali et al. (2004). Ten healthy seronegative dogs, from a non endemic area, were submitted to the same procedure and used as negative controls.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3069 3182; fax: +55 31 3069 3380.
E-mail addresses: marciapilatti@yahoo.com.br (M.M. Pilatti), vidasnino@yahoo.com.br (S.A. Ferreira), melo@icb.ufmg.br (M.N. Melo), antero@cdtn.br (A.S.R. Andrade).

ARTICLE IN PRESS

2

M.M. Pilatti et al. / Research in Veterinary Science xxx (2009) xxx–xxx

The kDNA PCR-hybridization assay was performed according Ferreira et al. (2008). The target for amplification was a 120 base pairs (bp) sequence of *Leishmania* kDNA minicircle conserved region (Degraeve et al., 1994). For the hybridization step 10 μ l of each amplification product were spotted on a nylon membrane. Cloned kDNA minicircles from *L. (L.) chagasi*, labeled with 32 P[α]dCTP, were used as probes. Hybridization conditions were as previously described (Andrade et al., 2001). The kDNA seminested PCR (kDNA snPCR) was performed as previously described (Morales et al., 2002). Positive samples yielded a PCR product of 800 bp related to the variable region of kDNA minicircles. The internal transcribed spacer 1 nested PCR (ITS-1 nPCR) assay uses primers addressed to internal transcribed spacer 1 (ITS-1) between the genes coding for the small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) and 5.8S rRNA. The first reaction was performed according Schönian et al. (2003). Positive samples yielded a PCR product between 300 and 350 bp. For the second amplification 10 μ l of a 1:40 dilution of the first PCR product was added to 15 μ l of PCR mix under the same conditions as the first amplification but with the following primers (15 pmol each): 5'-CATTTCGATGATTACACC-3' and 5'-CGTTCCTCAACGAAATAGG-3'. After the second amplification positive samples yielded a PCR product between 280 and 330 bp. The *Leishmania* nested PCR (LnPCR) uses primers addressed to the variable region of SSU rRNA gene and was performed according Cruz et al. (2002). Amplification products of 603 and 353 bp were produced in the first and second amplifications, respectively. For all methods DNA samples of 1.0 μ l and positive controls (with *L. (L.) chagasi* genomic DNA) at 1.0 ng/ μ l were used. All amplification products were analyzed on 2% w/v agarose gels stained with ethidium bromide. The results were analyzed using the Pearson chi square test. The difference between the results was considered significant with *P* value <0.05.

The preliminary comparison using purified *L. (L.) chagasi* DNA showed that the kDNA snPCR presented the best sensitivity detecting up to 10 fg while all the other methods detected up to 100 fg (Table 1). According to Vitale et al. (2004) 100 fg correspond to DNA of a single parasite. In our hands the hybridization step increased 10 times the sensitivity of the kDNA PCR-hybridization assay and the second amplification increased 1000 times the sensitivities of the nested (ITS-1 nPCR and LnPCR) or seminested (kDNA snPCR) methods.

These results did not correlate well with those obtained from infected dogs by the conjunctival swab procedure (Table 2). The kDNA PCR-hybridization was able to detect parasites in 22/23 dogs (95.6%) and in 40/46 samples (86.9%), considering the right and the left conjunctivas. The kDNA snPCR was positive for 21/23 dogs (91.3%) and for 40/46 samples (86.9%). There was no statistical difference between the sensitivities of these two methods (*p* > 0.05). The statistical analysis was based on the samples positivities. The ITS-1 nPCR and LnPCR were both able to detect the parasites in 17/23 dogs (73.9%) and respectively 29/46 (63%) and 30/46

(65.2%) of the samples. The positivities of the kDNA based methods were significantly higher than the positivities obtained by the two methods based on ribosomal rRNA genes (*p* < 0.05). The first step (amplification) of the kDNA PCR-hybridization presented alone a positivity (69.6%) similar to the ITS-1 nPCR and LnPCR methods after the second amplification (73.9%). The nested (ITS-1 nPCR and LnPCR) and seminested (kDNA snPCR) methods showed satisfactory sensitivity only after the second amplification, since after the first amplification these assays were all able to detect parasites only in 7/23 dogs. Thirty percent of the samples in this study were reanalyzed and the reproducibility was of 94%. The dogs of control group were negative for all PCR methods and for the serological assays performed.

kDNA based methods were the most sensitive given that there are ~10,000 minicircles per parasite (Barker, 1980), while the SSU rRNA and ITS-1 targets have less than 200 copies per cell (Villalba and Ramirez, 1982). The results with samples obtained by the conjunctival swab (Table 2) showed that kDNA PCR-hybridization and kDNA snPCR methods presented similar sensitivities, however, kDNA PCR-hybridization assay has the advantage to allow sub-genus identification by the use of sub-genus specific probes in the hybridization step. Sub-genus specific probes allow the differentiation between *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis* that had also been found infecting dogs, although very rarely (Andrade et al., 2006). On the other hand, the kDNA snPCR primers are not adequate to amplify *L. (V.) braziliensis*. The ITS-1 nPCR and LnPCR showed similar sensitivities. This result is consistent with the similar number of targets per cell for both assays. Nevertheless, the ITS-1 nPCR allows species identification after restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the PCR product (digested by *HaeIII* enzyme) while the LnPCR is useful when species identification is not required. ITS-1 nPCR positive samples in this study were identified as *L. (L.) chagasi* (= *L. infantum*).

kDNA PCR-hybridization seems to be the best choice among the assays evaluated due to the following reasons: it presents a high sensitivity, is able to differentiate *L. (L.) chagasi* and *L. (V.) braziliensis* and avoids procedures with two successive amplifications (nested or seminested) that increase the likelihood of contamination. A drawback of this method is the need to use radioactive material (in the hybridization step) requiring special facilities. The kDNA snPCR, due to its high sensitivity, is also an attractive alternative in areas where *L. (V.) braziliensis* is absent. The ITS-1 nPCR, although less sensitive, allows specie identification and is an alternative for laboratories that do not intend to work with radioactive material. For the ITS-1 nPCR assay an increase in the DNA sample volume is desirable to improve its sensitivity. It must be considered that the sensitivities of all PCR assays reported in this study can be improved, as only 1.0 μ l DNA sample was used here and this volume can be increased at least to 10.0 μ l.

As a whole, our results support the applicability of the conjunctival swab for the canine leishmaniasis diagnosis, since this proce-

Table 1
Sensitivity of the four PCR assays for detection of *L. chagasi* DNA extracted from cultured promastigotes.

Method	Step	Quantity of <i>L. chagasi</i> DNA							
		10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg
kDNA PCR -hybridization	PCR	+	+	+	+	+	–	–	–
	Hybridization	+	+	+	+	+	–	–	–
kDNA snPCR	1st reaction	+	+	+	+	–	–	–	–
	2nd reaction	+	+	+	+	+	+	+	–
ITS-1 nPCR	1st reaction	+	+	+	–	–	–	–	–
	2nd reaction	+	+	+	+	+	+	–	–
LnPCR	1st reaction	+	+	+	–	–	–	–	–
	2nd reaction	+	+	+	+	+	+	–	–

+ Positive; – Negative.

Please cite this article in press as: Pilatti, M.M., et al. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis ... Res. Vet. Sci. (2009), doi:10.1016/j.rvsc.2009.02.005

ARTICLE IN PRESS

M.M. Pilatti et al./Research in Veterinary Science xxx (2009) xxx-xxx

3

Table 2
Comparison of PCR assays sensitivities using conjunctival swab samples.

Method	Dogs																							Positive dogs/Total dogs	Positive samples/Total samples*	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23			
kDNA PCR hybrid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16/23	27/46
kDNA snPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22/23	40/46
ITS-1 nPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7/23	13/46
LnPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21/23	40/46
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7/23	10/46
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17/23	29/46
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7/23	13/46
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17/23	30/46

+ Positive, - Negative; L - Left conjunctiva, R - Right conjunctiva; * Considering right and left conjunctivas.

ture associated with the most sensitive PCR assays showed sensitivities above of 90% for symptomatic dogs. The sensitivity of this method for diagnosis of asymptomatic dogs is now under study.

Acknowledgements

This research was supported by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN). We gratefully thank the Municipal Zoonotic Diseases Control Department of Belo Horizonte for supplying the dogs.

References

Andrade, A.S.R., Gomes, R.F., Fernandes, O., Melo, M.N., 2001. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 78, 261-267.

Andrade, H.M., Reis, A.B., Santos, S.L., Volpini, A.C., Marques, M.J., Romanha, A.J., 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 140, 231-238.

Barker, D.C., 1980. The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electron microscopy images of isolated, purified networks. *Micron* 11, 21-62.

Cruz, I., Cañavate, J., Rubio, L.M., Morales, M.A., Chicharro, C., Laguna, F., Jiménez-Mejías, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J. Spanish HIV-Leishmania Study Group, 2002. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infections in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (Suppl. 1), 185-189.

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. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 463-469.

Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 152, 257-263.

Mancianti, F., Gramiccia, L., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 566-567.

Morales, A.M., Cruz, I., Rubio, J.M., Chicharro, C., Cañavate, C., Laguna, F., Alvar, J., 2002. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Infectious Diseases* 185, 1533-1537.

Reithinger, R., Dujardin, J.C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 21-25.

Schönian, 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 47, 349-358.

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gomen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1779-33.

Tesh, R., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 52, 287-292.

Villalba, E., Ramirez, J.L., 1982. Ribosomal DNA of *Leishmania braziliensis*: number of ribosomal copies and gene isolation. *The Journal of Protozoology* 29, 438-444.

Vitale, S., Reale, M., Petrotta, A., Torina, A., Caracappa, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026, 193-43.

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](#)