

**“Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina:
Avaliação do *Swab* Conjuntival em cães
assintomáticos e em cães vacinados”**

Rodrigo Souza Leite

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
AVALIAÇÃO DO SWAB CONJUNTIVAL EM CÃES ASSINTOMÁTICOS E
EM CÃES VACINADOS**

Rodrigo Souza Leite

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

2010



Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
das Radiações, Minerais e Materiais

A presente dissertação de mestrado, intitulada **“Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina: avaliação do swab conjuntival em cães assintomáticos e em cães vacinados”**, de autoria de **Rodrigo Souza Leite**, foi defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2010, pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2010.

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

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo
René Rachou/ FIOCRUZ

Prof. Dra. Mariângela Carneiro
UFMG

Prof. Dra. Suely Epsztein Grynberg
CDTN

DEDICATÓRIA

*Aos que lutam para que os benefícios impostos pela
ciência sejam para todos.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela vida e por ter me escolhido para servi-lo em todas as coisas;
- Aos meus pais pelos incansáveis esforços na minha formação acadêmica, social e moral;
- Às minhas irmãs e à minha sobrinha, Maria Eduarda, por serem torcedoras incansáveis;
- A Washington pela amizade, apoio e incentivo;
- A Kennedy, Jateniel e Edimar, meus amigos e irmãos em Cristo pelas orações, incentivos durante estes mais de 20 anos de amizade.
- André Fadul, pela amizade que sobreviveu ao fim da graduação.
- Aos Irmãos em Sabará e aos Irmãos em Belo Horizonte pelas orações;
- Aos professores do Mestrado do CDTN;
- Ao Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade pela orientação deste trabalho;
- À Professora Maria Norma de Melo, pela colaboração;
- Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, Roseli e Cerisa, pelo apoio acadêmico;
- Aos colegas do mestrado da turma 2008, pela companhia e esforços conjuntos.
- A Márcia Pilatti, Sidney Almeida, Virginia Carregal e Aline Leandra Ferreira, companheiros de bancada;

- Ao Leonardo Ituassu pela colaboração na realização do diagnóstico clínico dos cães assintomáticos;
- Aos colegas do Laboratório de Radiobiologia;
- Às servidoras da biblioteca pelas orientações nas consultas e revisões bibliográficas;
- À Professora Dra Valéria Ruiz de Souza do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG, por ter despertado em mim o interesse pela ciência durante a iniciação científica;
- Aos colegas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz, local onde o gosto pela ciência foi cultivado;
- Aos colegas da Escola Professor Zoroastro Vianna Passos, em Sabará, por juntos renovarmos, diariamente, a crença na educação pública, gratuita e de qualidade;
- Aos colegas do Instituto Octavio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias, pelo companheirismo e incentivo;
- Aos servidores do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, em especial Maria do Carmo e Adamastor, pela colaboração na primeira parte deste trabalho;
- À 4ª Companhia do Batalhão de Polícia de Eventos da Polícia Militar de Minas Gerais, em especial à Capitã Denise, pela colaboração na segunda parte deste trabalho.
- Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, pela oportunidade de realização deste mestrado;
- A CNEN, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

“As coisas encobertas pertencem ao Senhor nosso Deus, mas as reveladas nos pertencem a nós e a nossos filhos para sempre...”

Deuteronômio 29:29

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: AVALIAÇÃO DO SWAB CONJUNTIVAL EM CÃES ASSINTOMÁTICOS E CÃES VACINADOS

Rodrigo Souza Leite

RESUMO

O controle epidemiológico da leishmaniose visceral (LV) no Brasil envolve a eliminação de cães infectados, portanto, métodos diagnósticos confiáveis são essenciais para evitar a transmissão da doença ou o sacrifício desnecessário de animais. O programa de controle da LV no Brasil é baseado em inquéritos sorológicos. Os métodos sorológicos, no entanto, apresentam problemas de sensibilidade e especificidade. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) demonstrou ser uma técnica rápida e sensível para a detecção de *Leishmania*, no entanto amostras não invasivas representam um instrumento essencial, neste contexto, uma vez que elas são mais simples, indolores e mais facilmente aceitas pelos proprietários de cães. Um método útil é o *swab* conjuntival (SC) que utiliza um *swab* estéril para a realização de um esfregaço das conjuntivas do cão. O SC mostrou-se altamente sensível para o diagnóstico da LV por PCR. O objetivo deste estudo foi avaliar através do SC a prevalência de animais infectados em dois grupos de cães: assintomáticos e vacinados contra a LV. O primeiro grupo foi composto por 30 animais assintomáticos, positivos nos diagnósticos sorológico e parasitológico. Os resultados do SC foram comparados com os obtidos através de duas amostras pouco invasivas, sangue (S) e biópsia de pele (BP). As amostras foram analisadas por dois métodos diferentes de PCR: kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR. O volume de amostra de DNA utilizada para o kDNA PCR-hibridização foi de 1,0 µL e para o ITS-1 nPCR o volume foi de 10,0 µL. Utilizando-se o SC o método kDNA PCR-hibridização detectou DNA de *Leishmania* em 24/30 cães (80%) através da conjuntiva direita (CD) e 23/30 cães (76,6%) utilizando-se a conjuntiva esquerda (CE), 17/30 cães (56,7%) por meio de BP e 4/30 cães (13,3%) com S. A positividade do SC obtida combinando-se ambas as conjuntivas foi de 90% (27/30 cães). A análise das amostras de SC pelo método ITS-1 nPCR revelou que 25/30 cães (83,3%) foram positivos utilizando-se a CD e 20/30 cães (66,6%) foram positivos via a CE. Pelo mesmo método 15/30 cães (50,0%) foram positivos através de BP e 17/30 cães (56,7%) com S. A positividade obtida combinando-se ambas as oculares foi de 83,3%. Para o método kDNA PCR-hibridização as positivities do SC para a CD e CE foram significativamente superiores ($p < 0.05$) as obtidas com BP e S. Diferença estatística em relação a BP e S foi verificada pelo método ITS-1 nPCR apenas para CD. Os

métodos kDNA PCR-hibridação e ITS-1 nPCR apresentaram sensibilidade semelhante para SC e amostras BP. Por outro lado, a positividade do ITS-1 nPCR para amostras de S, foi significativamente maior que a obtida pelo kDNA PCR-hibridação, indicando que a sensibilidade dos métodos de PCR pode variar de acordo com o tecido examinado. A melhor sensibilidade neste estudo (90%) foi obtido através de amostras SC (combinando-se as duas conjuntivas) associada ao kDNA PCR-hibridação. Este nível de sensibilidade foi semelhante ao obtido em outros estudos utilizando SC para o diagnóstico da LV em cães sintomáticos. O segundo grupo foi de 42 cães militares, todos vacinados contra a LV. Neste grupo os resultados do SC foram comparados aos obtidos por testes sorológicos. Os testes sorológicos foram realizados de forma independente por três laboratórios. Os laboratórios 1 e 2 (Lab1 e Lab2) foram laboratórios comerciais. O laboratório 3 (Lab3) foi o Laboratório de Referência Nacional. A primeira triagem sorológica realizada pelo Lab1 mostrou 15 cães reativos e 4 cães foram classificados como indeterminados. Devido à alta positividade encontrada neste ensaio, animais com sorologia reativa e indeterminada, diagnosticados pelo Lab1, foram submetidos a novos testes sorológicos pelos Lab2 e Lab3. O Lab2 confirmou apenas 3 cães reativos e 2 animais foram indeterminados. O Lab3 confirmou 7 cães reativos e 3 cães foram classificados como indeterminados. Os cães que foram confirmados como reativos no diagnóstico sorológico do Lab3 foram submetidos à eutanásia. O diagnóstico molecular por PCR, utilizando o SC em todos os 42 animais foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* em 17 cães. Comparando os resultados da PCR com os obtidos através do teste sorológico do Lab1, a PCR foi positiva para 10 casos reativos e um caso indeterminado, mas foi negativo para 5 reativos e 3 casos indeterminados. Além disso, a PCR foi positiva em 5 casos não reativos. Os casos reativos e indeterminados, de acordo com o Lab1 que foram PCR negativos, apresentaram resultados negativos nos testes sorológicos dos Lab2 e Lab3. Para o Lab2, a PCR confirmou os 3 casos reativos e foi positiva para os 2 casos indeterminados. Em relação ao Lab3, a PCR confirmou todos os 7 casos reativos e foi positiva para os 3 casos indeterminados. O ensaio de PCR confirmou todos os casos, simultaneamente reativos nos testes sorológicos de dois laboratórios. Nossos resultados mostraram que o SC é um método sensível e prático para coleta de amostra permitindo diagnósticos confiáveis por PCR, além de apresentar sensibilidade superior a outras amostras pouco invasivas. Concluímos que o uso do SC deve ser considerado para os inquéritos caninos rotineiros para a LV.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina; diagnóstico; PCR; cães assintomáticos; cães vacinados, *swab* conjuntival.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL *LEISHMANIASIS*: CONJUNCTIVAL SWAB EVALUATION IN ASYMPTOMATIC DOGS AND VACCINATED DOGS

Rodrigo Souza Leite

ABSTRACT

The epidemiological control of visceral *Leishmaniasis* (VL) in Brazil involves the elimination of infected dogs. Therefore, reliable diagnostic tests are essential to prevent the transmission of the disease or unnecessary culling of dogs. The VL control in Brazil is based on serological surveys, nevertheless serologic assays present problems related to sensitivity and specificity. Polymerase chain reaction (PCR) proved to be a rapid and sensitive technique for detection of *Leishmania*. However, non-invasive samples are an essential tool in this context, since they are simpler, painless and more easily accepted by dog owners. A useful method is the conjunctival swab (CS) that uses a sterile swab to sample the dog conjunctiva. The SC was highly sensitive for the VL diagnosis by PCR. The objective of this study was to evaluate by CS the prevalence of infected animals in two groups of dogs: asymptomatic and vaccinated against VL. The first group had 30 asymptomatic dogs with positive serological and parasitological tests. The SC samples were compared with two non-invasive samples: blood (B) and skin biopsy (SB). The samples were analyzed by two different PCR methods: kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR. The volume of DNA sample used for kDNA PCR-hybridization was 1.0 μ L and ITS-1 nPCR volume was 10.0 μ L. The DNA sample volume used was of 1.0 μ L and 10.0 μ L respectively. Using CS samples the kDNA PCR-hybridization was able to detected parasite DNA in 24/30 dogs (80%) using the right conjunctiva (RC) and 23/30 dogs (76.6%) with the left conjunctiva (LC), 17/30 dogs (56.7%) by means of SB and 4/30 dogs (13.3%) with B. The CS positivity obtained combining RC and LC results was of 90% (27/30 dogs). The assay of CS samples by ITS-1 nPCR revealed that 25/30 dogs (83.3%) were positive when using RC and 20/30 dogs (66.6%) were positive when using LC. Via the same method 15/30 dogs (50.0%) were positive by SB and 17/30 dogs (56.7%) with B. The CS positivity obtained by ITS-1 nPCR combining RC and LC was of 83.3%. The CS positivities for RC and LC were significantly higher ($p < 0.05$) than SB and B for kDNA PCR- hybridization method. Statistical difference in relation to SB and B was verified by ITS-1 nPCR only for RC. Methods kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR showed similar sensitivities to CS and SB samples. Moreover, the positivity of ITS-1 nPCR

for B samples, was significantly higher than that obtained by kDNA PCR-hybridization, indicating that the sensitivity of the PCR may vary with the tissue examined. The best sensitivity in this study (90%) was obtained from CS samples (by combining both conjunctivas) associated with kDNA PCR-hybridization. This level of sensitivity was similar to that obtained in other studies using CS for the VL diagnosis in symptomatic dogs. The second group was of 42 military dogs, all of them vaccinated against VL. In this group CS and compared with the results obtained by serological tests. The serological tests were carried out independently by three laboratories. Laboratories 1 and 2 (Lab1 and Lab2) were private laboratories. Laboratory 3 (Lab3) was the National Reference Laboratory. The first serological screening performed by the Lab 1 showed 15 reactive dogs and 4 dogs were classified as indeterminate. Due to the high positivity found in this test, animals with reactive and indeterminate serology according Lab 1 were subjected to new serological tests by Lab 2 and Lab 3. Lab 2 confirmed only 3 reactive dogs and 2 animals were undetermined. The Lab 3 found 7 reactive dogs and 3 dogs were classified as indeterminate. Dogs that were confirmed as reactive by Lab 3 were euthanized. The molecular diagnosis by PCR, using CS, was performed in all 42 animals and was able to detect *Leishmanial* DNA in 17 dogs. Comparing the PCR results with those obtained by serological test of Lab 1, PCR was positive for 10 reactive and one indeterminate case, but was negative for 5 reactive and 3 indeterminate cases. In addition, the PCR was positive in 5 non-reactive cases. The reactive and indeterminate cases according to Lab 1 that were PCR negatives, tested negative in the serologic assays of Lab 2 and Lab 3. For the Lab 2, the PCR confirmed the 3 reactive cases and was positive for the 2 indeterminate cases. In relation to Lab 3, the PCR confirmed all 7 reactive cases and test positive for the 3 indeterminate cases. The PCR assay confirmed all cases simultaneously reactive in the serologic tests of two laboratories. Our results showed that the SC is a sensitive and practical method for collecting samples, allowing reliable diagnostic tests by PCR and showed higher sensitivity than other low invasive samples. We conclude that the use of CS for the regular screenings of dogs by PCR should be considered.

Keywords: Canine visceral *Leishmaniasis*; diagnosis; PCR; asymptomatic dogs; vaccinated dogs; swab conjuntival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama da classificação das diferentes espécies de <i>Leishmania</i> (RODRIGUES, 2006).....	24
Figura 2 - Sinais Clínicos da Leishmaniose.	29
Figura 3 - Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral (LV).	33
Figura 4 - Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por unidade federativa de 1983 a 2006.	35
Figura 5 - Coleta de amostra pelo método do swab conjuntival. (FERREIRA <i>et al.</i> , 2008). ..	56
Figura 6 - Autorradiograma de amostras de sangue de cães assintomáticos pelo método kDNA PCR-hibridização.	67
Figura 7 - Autorradiograma de amostras de pele de cães assintomáticos pelo método kDNA PCR-hibridização.	68
Figura 8 - Autorradiograma de amostras de <i>swab</i> conjuntival de cães assintomáticos por kDNA PCR-hibridização.....	69
Figura 9 – Amostras de sangue de cães assintomáticos amplificadas pelo método ITS-1 nPCR.	71
Figura 10 - Amostras de pele de cães assintomáticos amplificadas pelo método ITS-1 nPCR.	72
Figura 11 - Amostras de <i>swab</i> conjuntival de cães assintomáticos amplificadas pelo método ITS-1 nPCR.	73
Figura 12 - RFLP de amplicons de ITS-1 nPCR de <i>swab</i> conjuntival de cães assintomáticos.	75
Figura 13 – Comparação das positividade dos métodos kDNA PCR- hibridização e ITS-1 nPCR para as diferentes amostras clínicas.	77
Figura 14 - Análise de <i>Swab</i> Conjuntival de cães vacinados pelo método ITS-1 nPCR.	80
Figura 15 - RFLP de <i>amplicons</i> de ITS-1 nPCR dos cães vacinados.	81
Figura 16 – Comparação das taxas de positividade encontradas nos diagnósticos clínico, sorológico e molecular para um grupo de cães vacinados.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado das análises realizadas pelo método kDNA PCR-hibridização em amostras de sangue, pele e <i>swab</i> conjuntival em cães assintomáticos.	70
Tabela 2 - Resultado das análises realizadas pelo método ITS-1 nPCR em amostras de sangue, pele e <i>swab</i> conjuntival em cães assintomáticos.	74
Tabela 3 – Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM01 a PM07.	83
Tabela 4 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM08 a PM22	84
Tabela 5 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM23 a PM46	85
Tabela 6 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM37 a PM42	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

³²P	Fósforo trinta e dois
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos
bp	<i>base pair</i> (pares de base)
BP	Biopsia de pele
CD	Conjuntiva direita
CE	Conjuntiva esquerda
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanina trifosfato
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
dTTP	Desoxitimina tri-fosfato
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Funed	Fundação Ezequiel Dias
gp63	Glicoproteína de 63 KDa
gp70	Glicoproteína de 70 KDa
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
hsp70	<i>70 KDa Heat shock protein</i> (Proteína de Choque Térmico de 70 KDa)
ITS-1	<i>Internal transcribed spacer 1</i> (região espaçadora interna transcritível 1)
ITS-1 nPCR	<i>Internal transcribed spacer 1 nested PCR</i>
Kb	Quilobase
kDNA	DNA de cinetoplasto
Lab1	Laboratório 1

Lab2	Laboratório 2
Lab3	Laboratório 3
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (Salina tampão fosfato)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
S	Sangue
SC	<i>Swab</i> conjuntival
SSC	<i>Solution of Sodium Citrate</i> (Solução de citrato de sódio)
TBE	Tris Borato EDTA

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>g</i>	Gravidade
J	Joules
KDa	Quilodalton
M	Molar (mol/L)
m/v	massa/volume
MeV	Megaeletronvolt
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
V	Volt
v/v	volume/volume
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitros

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	8
<i>ABSTRACT</i>	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 RESERVATÓRIOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL E O PAPEL DO CÃO.....	25
2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM HUMANOS	27
2.3 VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)	30
2.4 EPIDEMIOLOGIA	31
2.4.1 <i>A leishmaniose visceral no Brasil</i>	34
2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	38
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GERAL	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
5 METODOLOGIA	51
5.1 ANIMAIS	52
5.1.1 <i>Cães assintomáticos</i>	52
5.1.2 <i>Cães vacinados contra a LVC</i>	52
5.1.3 <i>Ética na experimentação animal</i>	52
5.2 COLETA DE AMOSTRAS	53

5.2.1	<i>Sangue</i>	53
5.2.2	<i>Biopsia de pele</i>	53
5.2.3	<i>Medula óssea</i>	53
5.2.4	<i>Swab conjuntival</i>	53
5.3	EXAME SOROLÓGICO	54
5.4	EXAME PARASITOLÓGICO	54
5.5	EXTRAÇÃO DE DNA	57
5.6	REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	59
5.6.1	<i>kDNA PCR- hibridização</i>	59
5.6.1.1	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	59
5.6.1.2	<i>Dot Blot e Hibridização</i>	60
5.6.2	<i>ITS-1 nPCR (Internal transcribed spacer 1 nested PCR)</i>	61
5.6.2.1	<i>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	62
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
6	RESULTADOS	63
6.1	CÃES ASSINTOMÁTICOS	64
6.1.1	<i>PCR kDNA-hibridização</i>	64
6.1.2	<i>ITS-1 nPCR</i>	65
6.1.3	<i>Comparação entre os métodos kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR</i>	76
6.2	CÃES VACINADOS	78
7	DISCUSSÃO	87
7.1	CÃES ASSINTOMÁTICOS	88
7.2	CÃES VACINADOS	89
8	CONCLUSÕES	93
9	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO A – ARTIGO ACEITO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL	106

1. INTRODUÇÃO

Um programa de combate e controle da LV surgiu no Brasil na década de 1950 e tinha como principal objetivo interromper a cadeia de transmissão da doença, no entanto, tal iniciativa mostrou-se ineficiente ao longo das últimas décadas, o que levou o Ministério da Saúde e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002) a convocarem um comitê para reexaminar seu plano de ação (COSTA, 2001). Essa reavaliação vem sendo orientada por estudos científicos e outros fatores de ordem operacional como: constatação de que outros reservatórios como raposas e marsupiais podem ser fontes de transmissão dos parasitos; conflitos entre os estudos a respeito do real impacto do sacrifício de cães sobre a infecção humana; existência de pouco conhecimento sobre o impacto das estratégias de combate ao vetor; inexistência de uma padronização dos métodos diagnósticos da doença em humanos e em cães (GONTIJO, et al., 2004).

Neste contexto, tem sido ressaltada nos últimos anos a necessidade de uma maior aproximação e sinergia entre pesquisadores e agentes de saúde pública no combate à doença. Diante das dificuldades operacionais de combate à LV, especialmente nas regiões urbanas, tornam-se necessários mais investimentos na área técnico-científica e aperfeiçoamento das estratégias de controle e vigilância da doença. Todas estas medidas devem ser integradas de modo que elas possam ser mais efetivas (ELKHOURY, 2005).

A pesquisa de diagnósticos alternativos mais sensíveis, práticos e específicos deve ser prioritária para auxiliar a prevenção, vigilância e controle das leishmanioses. O investimento em procedimentos de diagnóstico vem sendo apontado como necessário para redução da morbidade, mortalidade e da letalidade da LV, bem como para a diminuição dos riscos de transmissão (ELKHOURY, 2005).

Esta dissertação relata a avaliação da eficácia do *swab* conjuntival (SC) como um método de amostragem para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) por PCR.

Para isto foram estudados dois grupos independentes de cães: o primeiro composto por cães assintomáticos e o segundo por cães militares vacinados contra a LVC. Vale ressaltar que este estudo foi inédito visto que a metodologia do SC nunca havia sido testada nos grupos citados.

No primeiro grupo, o SC foi comparado a biópsias de pele (BP) e amostras de sangue (S), dois tipos de amostras pouco invasivas potencialmente úteis para a triagem em massa de cães. Foram avaliados 30 cães assintomáticos, simultaneamente positivos em testes sorológicos e parasitológicos. As amostras foram analisadas por dois métodos diferentes de PCR: kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR. No segundo grupo, o objetivo foi avaliar a prevalência de animais infectados em um grupo de cães militares, todos vacinados contra a LV, usando o SC para coleta de amostras para a PCR e comparar os resultados com aqueles obtidos por testes sorológicos. Os testes sorológicos foram realizados de forma independente por três laboratórios. Os laboratórios 1 e 2 (Lab1 e Lab2) foram os laboratórios comerciais. O Laboratório 3 (Lab3) foi o Laboratório de Referência Nacional.

Este estudo visa contribuir para disponibilizar para a sociedade uma ferramenta valiosa no controle da Leishmaniose Visceral.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A leishmaniose é uma doença parasitária de caráter zoonótico e representa hoje um grande problema de saúde pública mundial. Seus aspectos epidemiológicos são complexos, dada a grande variedade de fatores envolvidos. Exemplos destes fatores são: a diversidade de hospedeiros, as diferentes espécies do agente etiológico e a dinâmica dos processos ecológicos e sociais que determinam a distribuição geográfica dessa enfermidade.

Em relação ao agente etiológico são conhecidas cerca de 30 espécies heteroxênicas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Figura 1). Deste total, 13 ocorrem no continente americano (GRIMALDI; TESH, 1993). Esses parasitos são intracelulares obrigatórios quando presentes nos hospedeiros vertebrados, se apresentando sob a forma amastigota. Nos hospedeiros invertebrados, as células de *Leishmania* se transformam nas formas promastigotas, as quais passam por dois estágios de desenvolvimento bem distintos. O primeiro se caracteriza por células de alta capacidade de divisão chamadas de promastigotas procíclicas. No segundo estágio, as células de *Leishmania* passam a apresentar formato alongado e um longo flagelo, sendo chamadas promastigotas metacíclicas que se constituem na forma infectante para os hospedeiros vertebrados (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

O modo mais importante de sua transmissão se dá através da picada de insetos fêmeas da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos. No Velho Mundo, as espécies transmissoras do parasito se incluem no gênero *Phlebotomus*, enquanto que, no Novo Mundo, predomina o gênero *Lutzomyia* (GRIMALDI; TESH, 1993; DESJEUX, 1996). As espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* estão diretamente relacionados com a transmissão da doença. A primeira é considerada a principal transmissora de *L.(L.) chagasi* no Brasil. A segunda espécie foi posteriormente apontada como vetor no estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS, *et al.*,1998).

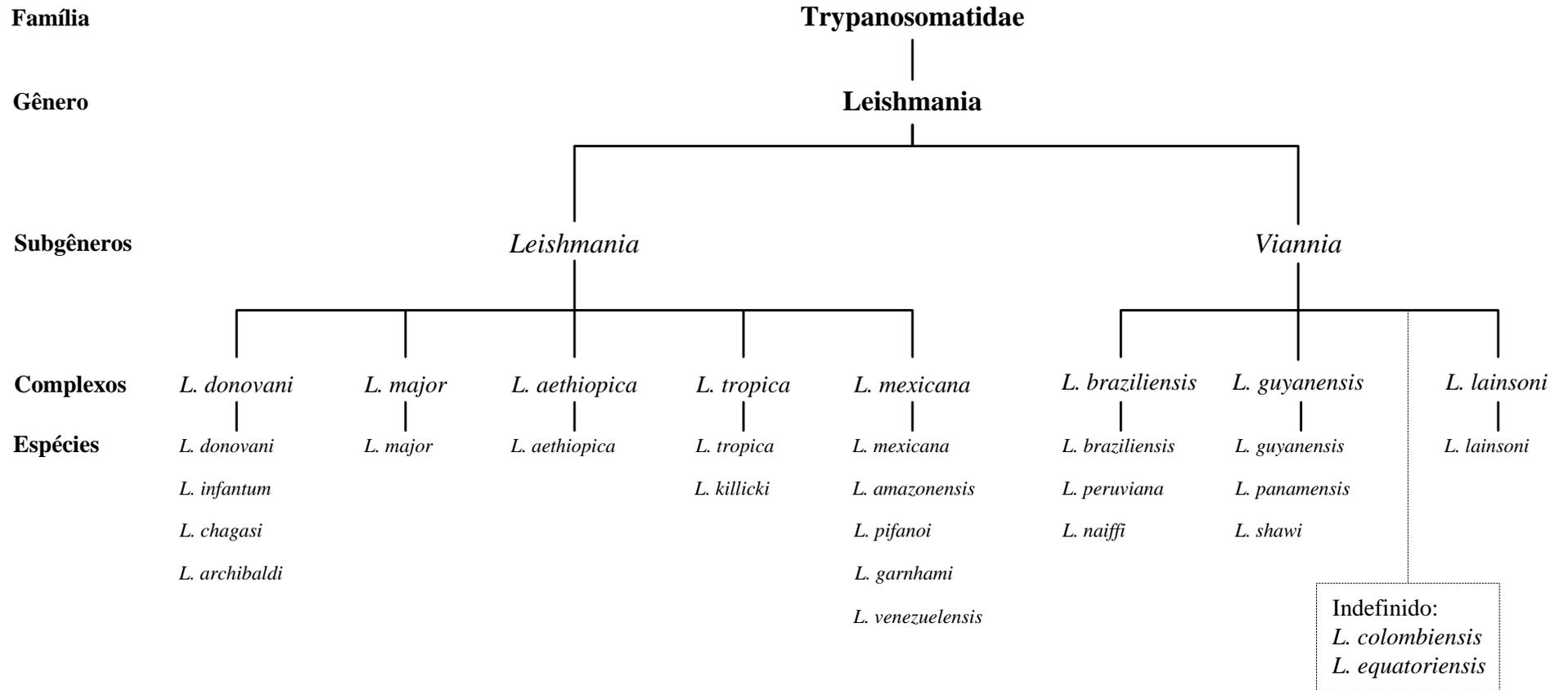


Figura 1 - Diagrama da classificação das diferentes espécies de *Leishmania* (RODRIGUES, 2006)

2.1 Reservatórios da Leishmaniose Visceral e o papel do cão

A *Leishmania (Leishmania) chagasi* possui como reservatórios silvestres as raposas e marsupiais. Estes animais possuem hábitos sinantrópicos e isto provavelmente está relacionado à ligação entre os ciclos silvestre e doméstico da doença. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o real papel desses animais no ciclo de transmissão da LV. No ambiente domiciliar, o cão é o principal hospedeiro de *L. (L.) chagasi* (SANTOS, *et al.*, 1998).

Em relação aos diversos hospedeiros da *L. (L.) chagasi*, o cão assume um papel central na manutenção do ciclo da enfermidade dada à grande susceptibilidade deste animal e a sua proximidade com o homem. Nas regiões brasileiras endêmicas da doença, os cães são muito expostos ao flebótomo, pois frequentemente dormem ao relento e próximos às aves domesticadas, as quais são refratárias à moléstia, mas atraem fortemente os insetos vetores (NEVES, 2006). A pele canina, uma vez infectada, passa a apresentar altos níveis de amastigotas o que aumenta a chance de contaminação de outros flebotomíneos.

Em geral, a doença no cão é crônica e sistêmica. Porém, a forma aguda e grave pode ocorrer levando o animal à morte em poucas semanas. Após a infecção da pele em cães susceptíveis, há a disseminação do parasito para vários órgãos e posteriormente surgem os sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As manifestações clínicas clássicas incluem lesões na pele como dermatite exfoliativa e ulcerações, alopecia, perda de peso, caquexia, onicogribose, linfadenopatia, esplenomegalia e falência renal, sendo esta última uma das principais causas de óbito (MORENO; ALVAR, 2002). A alopecia gerada pela infecção expõe maiores áreas da pele extensamente parasitadas o que facilita ainda mais a infecção de outros flebotomíneos. A extensão dos sinais clínicos está intimamente relacionada com o tipo de resposta imunológica apresentada pelo animal infectado.

Estudos com infecções experimentais em cães mostraram que o período de incubação é bastante variável, girando em torno de três meses a vários anos (ANDRADE, 2000). Então, é comum muitos animais infectados não apresentarem sintomas clínicos durante um longo tempo, o que prejudica os levantamentos epidemiológicos e o combate à doença. De acordo com dados estatísticos, cerca de 52% dos cães infectados assintomáticos podem evoluir para cura espontânea, 12% permanecem longo tempo parasitados e sem sintomas e 36% manifestam a doença mais tarde (NEVES, 2006).

Tem sido amplamente relatado que o fluxo de transmissão da LV é independente da extensão dos sintomas apresentados pelo cão. Há relatos de que cães soropositivos assintomáticos permitiram a transmissão do parasito para flebotomíneos (SOLANO-GALLEGO, *et al.*, 2001), (SOUZA, *et al.*, 2001), (ALVAR, *et al.*, 2004). Sendo assim, os cães são um reservatório competente e importante do protozoário em questão. Esta relevância foi confirmada mediante observações especialmente nas zonas urbanas com transmissão recente onde os casos caninos da doença precederam os casos humanos. Nestas regiões, foi comprovada uma associação na distribuição espacial da LV em cães e no homem (DI LORENZO; PROIETTI, 2002).

O Ministério da Saúde recomenda três medidas básicas de controle: (1) tratamento precoce das pessoas infectadas, (2) combate ao vetor e (3) eliminação dos cães infectados (PALATNIK-DE-SOUZA, *et al.*, 2001), (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Portanto, o diagnóstico da leishmaniose canina é uma etapa fundamental no controle da enfermidade e inquéritos extensivos para a sondagem de animais contaminados têm sido preconizados. O diagnóstico deve ser feito, de preferência, de uma maneira precoce através de um método suficientemente confiável e robusto. Ainda hoje, o desenvolvimento e a padronização de uma técnica enquadrada nestes critérios e que seja rápida, barata e de simples manuseio permanecem como objetivos a serem alcançados.

2.2 Manifestações clínicas em Humanos

A leishmaniose é uma doença polimórfica para os humanos apresentando diferentes manifestações clínicas (Figura 2) sendo as principais formas da doença:

- *Leishmaniose visceral (LV)*: É também chamada de calazar e é considerada uma doença crônica e sistêmica. Nesta modalidade, os parasitos demonstram tropismo pelas células do sistema fagocitário mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. Os sintomas clássicos que podem ocorrer nos indivíduos afetados são acessos febris irregulares, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. A LV é considerada a forma mais grave da doença, sendo fatal em 95% dos casos não tratados;

- *Leishmaniose tegumentar*: Existem duas formas principais que dependem da espécie do agente etiológico e da resposta imune do hospedeiro:

- a) *Leishmaniose cutânea (LC)*: Nesta forma, uma lesão bem delimitada, ulcerada ou não, se desenvolve no local da picada do inseto vetor e pode se curar espontaneamente ou persistir por longo tempo. Em algumas situações, a lesão pode se difundir especialmente nos pacientes imunodeprimidos.

- b) *Leishmaniose mucocutânea (LMC)*: Essa manifestação caracteriza-se por progressão lenta e crônica. Implica em metástases da lesão primária, as quais podem atingir as mucosas nasobucal e faringiana, causando destruição extensiva e desfigurante de tecidos moles e cartilagens, o que pode incapacitar o indivíduo para o trabalho e o convívio social.

- c) *Leishmaniose dérmica pós-Calazar (LDPC)*: Esta forma da doença é frequente na Índia e no Sudão. A LDPC manifesta como múltiplas máculas hipocrômicas pápulas eritematosas e nódulos (ZIJLSTRA, et al., 2000). Normalmente uma

erupção macular eritematosa nas bochechas é a primeira manifestação da doença (RAMESH, et al., 1995).

Todas as formas da doença podem começar com uma pequena lesão cutânea, mas o subsequente desenvolvimento e prognóstico são determinados, em grande parte, pela espécie de *Leishmania* envolvida (GRIMALDI; TESH, 1993).



Figura 2 - Sinais Clínicos da Leishmaniose.

a) Leishmaniose cutânea; b) Leishmaniose mucocutânea; c) Leishmaniose visceral; d) Leishmaniose dérmica pós-Calazar (CHAPPUIS, *et al.*, 2007)

2.3 Vacinas contra a Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A busca por uma vacina eficaz tem sido uma das principais preocupações de vários grupos de pesquisa. O trabalho pioneiro de Genaro *et al.* (1996), avaliando a eficácia das vacinas produzidas com diferentes antígenos bruto de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, em comparação ao placebo em uma população de cães na cidade de Montes Claros, Minas Gerais, mostrou a ausência de proteção, mas um fator limitante importante nesse estudo foi o número elevado de perdas de sequência nos grupos avaliados (Oliveira, *et al.*, 2008).

Palatnik-de-Sousa *et al.* (1993; 1996), propôs uma vacina baseada em fucose ligada manose (FML), obtido a partir de uma cepa de *L. (L.) donovani*. Esta vacina agora está sendo comercializada pelo laboratório Fort Dodge Animal Health (Overland Park, E.U.A.), sob o nome comercial de Leishmune®. Borja-Cabrera *et al.* (2006) mostraram em uma área endêmica no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, que esta vacina é imunogênica, com uma forte resposta humoral. Estudos mais recentes demonstraram que menos de 3% dos animais vacinados seriam soropositivos nas reações de ELISA e IFI realizadas com os kits de Biomanguinhos, recomendados pelo Ministério da Saúde e utilizados pelos laboratórios oficiais.

Novas vacinas produzidas a partir de DNA foram avaliadas. Ghosh *et al.* (2001) observaram que a vacina de DNA contra proteína A2 de *L. (L.) donovani* aumenta a resposta celular e humoral. Fernandes *et al.* (2008) investigaram a imunogenicidade e imunidade protetora contra *L. (L.) chagasi* induzidas pela vacinação com uma formulação contendo a proteína recombinante A2, um antígeno amastigota específico, e saponina. Os animais vacinados produziram níveis significativamente elevados de IgG total e IgG2, mas não IgG1 anti-A2, e mantiveram-se negativos nos métodos convencionais de diagnóstico sorológico

para leishmaniose. Uma vacina, com nome comercial Leishtec® está sendo comercializada pela Hertape Calier Saúde Animal S.A.

Apesar das várias propostas de vacinas produzidas com diferentes técnicas, os ensaios clínicos ainda são necessários para provar a sua eficácia (Oliveira, *et al.*, 2008). Neste contexto, em 2007 o Ministério da Saúde junto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicaram a Instrução Normativa Interministerial 31 (IN-31) que regulamenta a pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacinas contra a LV. Com isso, o desenvolvimento de vacinas anti-LVC deve contemplar a realização de testes para determinar a segurança, a eficácia, a inocuidade, a proteção a infecção e a imunogenicidade das vacinas conduzidas por meio de ensaios de fases I, II e III. As duas vacinas citadas possuem resultados para os ensaios de fase I e II e, por já estarem em comercialização, as empresas fabricantes deverão apresentar os estudos de fase III até agosto de 2010 para continuar ou não a comercialização. Embora as vacinas sejam autorizadas pelo MAPA, o Ministério da Saúde ainda não recomenda o seu uso em Saúde Pública (Ministério da Saúde, *et al.*, 2009).

2.4Epidemiologia

Em termos globais, a leishmaniose é a terceira moléstia mais importante dentre as veiculadas por vetores, ficando aquém apenas da malária e da filariose linfática (DAVIES; REITHINGER, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é endêmica em 88 países, aproximadamente 14 milhões de pessoas são consideradas infectadas e outras 350 milhões estão expostas a situações de risco. São notificados, por ano no mundo, cerca de 2 milhões de novos casos dessa enfermidade sendo que a LC contribui com aproximadamente 1,5 milhão enquanto a forma visceral tem 500 mil registros (OMS, 2007).

A LV pode ser provocada por três espécies. No Sudão, Kênia, Nepal, Bangladesh, China Oriental, Paquistão e Índia, predomina a *Leishmania (Leishmania) donovani* e nessas regiões a doença tem caráter antroponótico. No sudeste asiático, nordeste da China, norte da África e Europa mediterrânea, prevalece *Leishmania (Leishmania) infantum* enquanto que *Leishmania (Leishmania) chagasi* está presente nas Américas (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003). Nestes dois últimos casos, a LV assume um perfil zoonótico.

Sessenta e cinco países são considerados endêmicos para LV e estima-se que 200 milhões de pessoas estão sob condições de risco de contaminação. O número de óbitos anuais registrados chega a 59 mil e este é somente ultrapassado pelo número de mortes causadas pela malária dentre as doenças parasitárias (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Dada a ampla abrangência e o significativo aumento de casos da doença, o Programa Especial de Pesquisas e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR), vinculado à OMS, considera a leishmaniose uma prioridade em suas pesquisas dentre as 10 principais endemias tropicais do mundo (OMS, 2007).

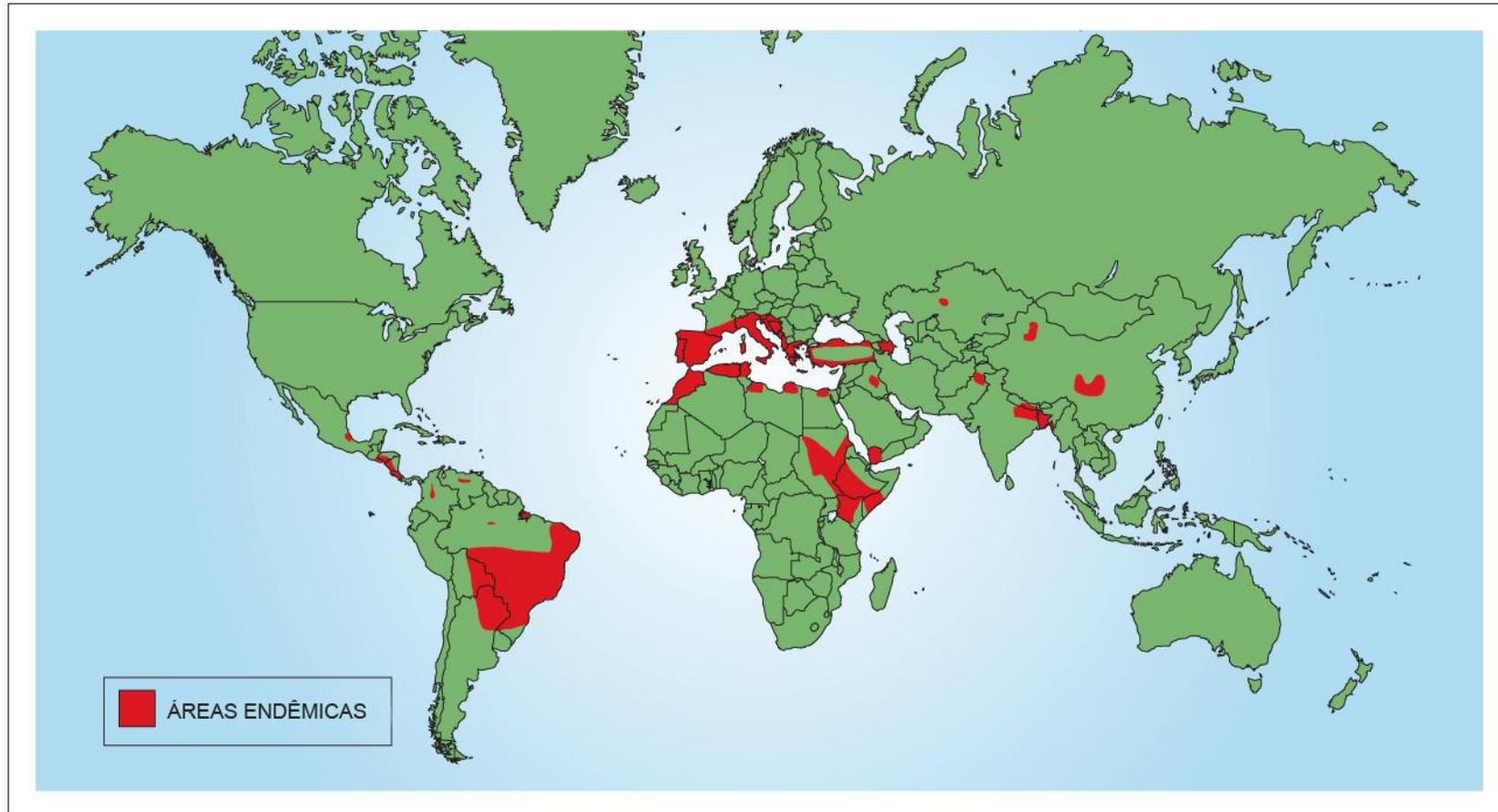


Figura 3 - Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral (LV).

A maioria dos casos ocorre em apenas seis países - Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (DESJEUX, 2004).

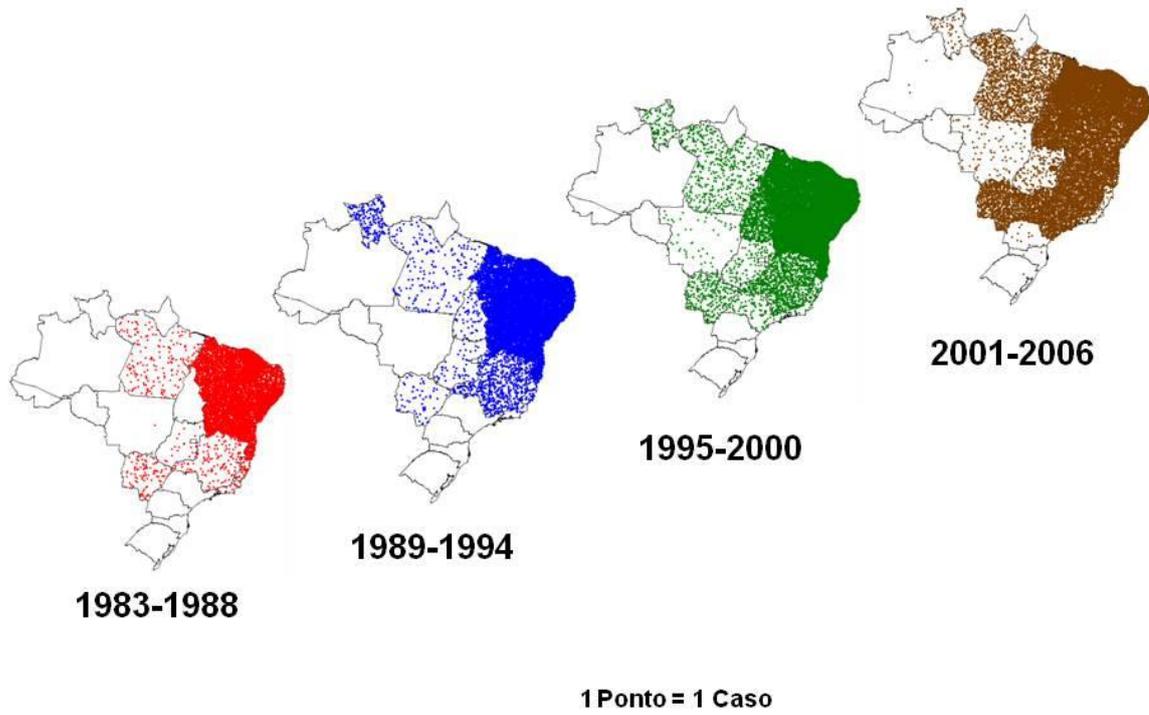
2.4.1 A leishmaniose visceral no Brasil

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

Especificamente em relação ao Brasil, a LV demonstra ampla distribuição atingindo todas as regiões (Figura 4). Por isso, a LV possui aspectos geográficos e sociais bem diferenciados e complexos. Das 27 unidades federativas do país, 20 possuem casos autóctones registrados da doença, atingindo as cinco regiões do país. A região Nordeste concentrou mais de 90% dos casos humanos na década de 90 e atualmente responde por 56% do total de casos no país, seguida pela região Sudeste (19%), região Norte (18%) e Centro-Oeste (7%) (MINISTÉRIO SAÚDE, 2010).

A partir dos anos 90, novos surtos e focos da doença foram registrados nos estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste). Essas regiões passaram então a influir significativamente nas estatísticas da LV no Brasil. A partir daí, tem-se observado uma tendência crescente da incidência de casos de LV. Este aumento vem ocorrendo de maneira mais pronunciada desde 1999 (FUNASA, 2002). Cerca 3500 casos de LV são notificados, em média, a cada ano no país. As taxas de letalidade, segundo registros oficiais, chegam a 10% em algumas localidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007a).

A LV ocorre tipicamente em regiões caracterizadas por baixo nível socioeconômico, o que é muito comum em áreas rurais e periurbanas do Brasil. No entanto, esse quadro vem se modificando especialmente nos estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde a LV vem sofrendo um processo de urbanização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

Figura 4 - Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por unidade federativa de 1983 a 2006.

O estabelecimento de uma doença parasitária em uma determinada região depende fundamentalmente da presença de hospedeiros e vetores igualmente susceptíveis. No passado, a leishmaniose possuía um caráter essencialmente silvestre uma vez que o vetor vive naturalmente em regiões de mata e de florestas. No entanto, a colonização humana abrupta, descontrolada e intensa reduziu drasticamente o hábitat natural dos flebotomíneos bem como a disponibilidade de seus hospedeiros naturais. Tais fatores somados a uma adaptação bem sucedida do inseto vetor ao ambiente peridomiciliar permitiram que ele passasse a infectar, via repasto sanguíneo, o cão e o homem. Isto fez com que a leishmaniose adquirisse um caráter tipicamente rural.

Por outro lado, a enfermidade vem se urbanizando cada vez mais. Isto se deve a diversos fatores como a globalização econômica, a concentração de riquezas, êxodo rural proveniente de regiões mais pobres, desmatamentos, alta densidade populacional e à grande susceptibilidade da população à doença. Em 1950, menos de um terço da população mundial vivia nas cidades. Hoje, mais de 50% desta está nas grandes metrópoles e é estimado que mais de 5 bilhões de pessoas estejam nas regiões urbanas dentro de 50 anos (DAULAIRE, 1999). Na América do Sul, mais de 70% da população é urbana. Isto tende a levar endemias rurais para áreas metropolitanas onde a concentração humana e a presença de vetores aumentam a incidência de doenças. Ao mesmo tempo, houve grande proliferação de subúrbios pobres onde os cães vadios são numerosos e as condições sanitárias e nutricionais são precárias. As restrições alimentares graves associadas à presença de indivíduos imunossuprimidos, como os portadores do vírus HIV, expõem uma parcela significativa de pessoas extremamente vulneráveis ao avanço da leishmaniose (DESJEUX; ALVAR, 2003).

Paralelamente, o flebótomo acabou por encontrar no ambiente urbano um hábitat favorável à sua reprodução. Como resultado, o *Lutzomyia longipalpis*, por exemplo, tornou-

se muito numeroso nessas regiões, o que tem aumentado o número de casos da doença (OMS, 2002b).

Todo este panorama se deve a mudanças comportamentais de caráter sócio-ambiental, as quais têm provocado impactos sem precedentes. O aumento e a expansão da LV para áreas urbanas e periferias estão também relacionados às migrações humanas, envolvendo o transporte de cães infectados para regiões onde o inseto vetor já existia (ARIAS, *et al.*, 1996). A partir disso, criaram-se condições concretas para a transição efetiva do ciclo rural da doença para o ciclo em grandes metrópoles e regiões periféricas.

A adaptação do vetor aos ambientes urbanos foi concretamente comprovada no Brasil no final da década de 1980. Nesse cenário, os flebotomíneos passaram a ser encontrados em paióis, canis e também no ambiente intradomiciliar. Desde então, muitas cidades brasileiras como Fortaleza (CE), Aracaju (SE), Santarém (PA), Corumbá (MS), Palmas (TO), Araçatuba (SP), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Campo Grande (MS), Montes Claros e Belo Horizonte (MG) vêm apresentando, de maneira preocupante, mais casos autóctones da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007a).

Desde 1993, Belo Horizonte vem sofrendo com o acréscimo de casos humanos e caninos da LV. Sabe-se hoje que a doença foi introduzida nesta capital a partir de Sabará, um município vizinho (GONTIJO; MELO, 2004). De fato, na região metropolitana de Belo Horizonte, houve um aumento no número de municípios com notificação da doença de 6 no biênio 94/95 para 15 no biênio 98/99 (LUZ, *et al.*, 2001), (SILVA, *et al.*, 2001a). De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, Belo Horizonte é hoje o terceiro município brasileiro mais afetado pela LV, ficando atrás somente de Fortaleza e Campo Grande (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007b).

Por ser a urbanização da LV, no Brasil, um evento relativamente recente, pouco se sabe sobre sua epidemiologia no meio urbano. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão da doença nas cidades e regiões adjacentes brasileiras parecem ser bem mais complexas e diversificadas do que no ambiente rural e carecem de mais estudos para serem inteiramente explicadas (GONTIJO; MELO, 2004).

2.5 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Para um diagnóstico mais seguro da LV, recomenda-se a combinação de diferentes métodos, uma vez que essa doença apresenta um amplo espectro clínico tanto em humanos (REITHINGER; DUJARDIN, 2007) quanto em cães (GONTIJO; MELO, 2004) e ainda não existe um teste 100% específico e sensível (ALVAR, *et al.*, 2004). Sendo assim, é muito importante considerar conjuntamente dados laboratoriais, clínicos e epidemiológicos para a realização do diagnóstico do Calazar.

Um diagnóstico definitivo da LV canina (LVC) exige a detecção direta do parasito. Para sua demonstração, são comumente utilizados materiais de biópsias ou aspirados de medula óssea, linfonodos, baço ou fígado (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Com o material coletado são feitos esfregaços e colorações específicas em lâminas para análise microscópica e detecção de formas amastigotas do parasito. Para isto, a lâmina deve ser exaustivamente examinada antes de ser considerada negativa (DIETZE, 2006).

Podem ser feitos também cortes histológicos, inoculação de aspirados em animais de laboratório ou cultura *in vitro* em meio bifásico (GOMES, *et al.*, 2006). Esta modalidade de diagnóstico é considerada um padrão ouro, pois apresenta alta especificidade e, diante da positividade, não há dúvida quanto à presença da infecção. No entanto, a forma de coleta de amostras envolvida nesses procedimentos é invasiva, possui contra-indicações e pode causar complicações mais sérias em algumas ocasiões (GUERIN, *et al.*, 2002).

Devido à frequente ausência de sintomas clínicos nos cães e à dificuldade da detecção direta do parasito, o diagnóstico rápido e indireto da infecção canina tem se transformado em uma parte essencial dos programas de controle (BADARÓ, 1988). Muitos métodos de diagnóstico sorológico frequentemente utilizados nesses programas apresentam sensibilidades variando de 80% a 100%, e especificidades que vão de 80% a 98% (REED, *et al.*, 1990). Tais testes partem do pressuposto de que a maioria, ou todos os animais infectados, desenvolvem uma resposta imunológica humoral específica que pode ser detectada pelas metodologias disponíveis.

Nas áreas endêmicas do Brasil, onde a prevalência da LV é a maior das Américas, os cães são periodicamente analisados por sorologia, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o imunoenensaio enzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), (BADARÓ; REED; CARVALHO, 1981) (DIETZE, 2006). Ambos os testes envolvem a utilização de antígenos brutos e possuem algumas limitações quanto à sua especificidade e reprodutibilidade (SUNDAR; RAI, 2002), (SINGH, 2006). Nos últimos anos, novos antígenos purificados e recombinantes contendo epítopos específicos de *L.(L.) chagasi* e *L.(L.) donovani* têm sido obtidos e, com eles, melhores sensibilidades e especificidades vêm sendo apresentadas (GOMES, *et al.*, 2006). O teste RIFI é considerado menos sensível e mais específico do que o método de ELISA (GONTIJO; MELO, 2004). Estas metodologias são as utilizadas para nos inquéritos populacionais.

Os resultados da RIFI são normalmente expressos em diluições em que se considera um resultado positivo com um título igual ou superior a 1:40. No caso do ELISA, os resultados são medidos em unidades de absorbância com base em espectrofotometria na qual podem ser utilizadas diluições fixas (resultado quantitativo) ou somente presença ou ausência de reação (resultado qualitativo), (DIETZE, 2006).

Badaró e colaboradores (1996), desenvolveram o Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* (TRALd) que se baseia num método imunocromatográfico no qual a proteína recombinante de *L. (L.) chagasi* rK39 é fixada em membrana de nitrocelulose. Este procedimento se revelou simples e rápido e permitiu a obtenção de bons resultados no diagnóstico em cães e humanos. No entanto, a mesma técnica foi incapaz de detectar infecção em animais com baixos títulos de RIFI (GENARO, *et al.*, 1997).

Outro tipo de diagnóstico é baseado em testes moleculares os quais permitem a detecção de sequências de DNA específicas do parasito. A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) é um importante exemplo e é um procedimento que permite a amplificação de segmentos de DNA em até 1 milhão de vezes. Existem diferentes alvos de amplificação no genoma de *Leishmania* que já foram descritos para diagnóstico. Esses são normalmente sequências repetitivas e/ou polimórficas. Como exemplos, tem-se os genes para o RNA ribossomal e seus espaçadores, β -tubulina, locus gp63, hsp70, cisteino proteinases e minicírculos do DNA de cinetoplasto (kDNA), (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SINGH, 2006). Este último tem sido considerado um dos melhores alvos para PCR sendo que podem ser amplificados os minicírculos completos ou somente suas regiões conservadas (GONTIJO; MELO, 2004). Na era pós-genômica, vem ocorrendo a identificação e a caracterização de um número cada vez maior de sequências nucleotídicas potenciais de *Leishmania* para novos alvos de PCR. Isto contribui para aumentar a versatilidade dessa técnica.

Vários sistemas de detecção baseados na PCR foram desenvolvidos (SCHALLIG; OSKAM, 2002), e a busca de sua padronização é tida como um importante objetivo para os programas de controle da leishmaniose (OMS, 2002a). Muitos trabalhos já demonstraram a aplicabilidade da PCR para o diagnóstico da leishmaniose canina, indicando ser, esta, uma

técnica mais sensível e específica do que os métodos tradicionais (MANNA, *et al.*, 2004), (REALE, *et al.*, 1999), (SILVA, *et al.*, 2001c), (STRAUSS-AYALI, *et al.*, 2004).

Diagnósticos, com resultados mais precisos, são obtidos quando a PCR é combinada com outros métodos moleculares, como a hibridização de sondas de DNA (HEADINGTON, *et al.*, 2002). Este foi o primeiro procedimento em biologia molecular a ser desenvolvido para fins diagnósticos e hoje, já se dispõe de diferentes sondas específicas, tanto para sequências genéticas nucleares, quanto para regiões do genoma mitocondrial de *Leishmania* (DEGRAVE, *et al.*, 1994). Foi demonstrado em alguns estudos que o uso de sondas de kDNA permitiu a distinção entre os complexos *L.(V.) braziliensis* e *L.(L) mexicana*. Junto a essas pesquisas, percebeu-se que os minicírculos de kDNA contêm regiões com diferentes especificidades taxonômicas. Com esta evidência, sugeriu-se que as sequências de kDNA vêm sofrendo diferentes taxas de divergência evolutiva. Esta característica pode ser útil para diagnósticos, na medida em que ela pode auxiliar a identificar e diferenciar, com mais segurança, os subgêneros de *Leishmania*. Também, foi relatado que, com essas sondas, foi possível realizar estudos de caráter epidemiológico (ROGERS; WIRTH, 1987).

Para o processo de hibridização, as técnicas *Dot-Blot* e *Southern Blot* são, comumente, utilizadas. A primeira consta da aplicação dos produtos de PCR desnaturados em uma membrana, normalmente de *nylon* a qual recebe, posteriormente, as sondas marcadas, por exemplo, com radioisótopos como o ^{32}P . Quanto ao *Southern blot*, as amostras de DNA presentes num gel de agarose são desnaturadas. Em seguida, uma membrana de nitrocelulose ou *nylon* é colocada e pressionada sobre o gel, permitindo que o DNA passe para ela por capilaridade. Após isso, o ácido nucléico é fixado e a membrana é tratada com sondas marcadas complementares à sequência alvo do DNA do parasito. Após a auto-radiografia é feita a revelação e a verificação dos resultados. Estas técnicas têm se mostrado adequadas

para a detecção de fragmentos de DNA de *Leishmania* (BOZZA, *et al*, 1995), (SILVA, *et al*, 2004).

Neste trabalho a reação de PCR, no grupo de cães assintomáticos, foi utilizada com iniciadores endereçados para a região conservada dos minicírculos de kDNA (DEGRAVE, *et al.*, 1994). Os produtos amplificados foram hibridizados com sondas constituídas de minicírculos clonados de *L. chagasi* e marcados com ^{32}P . Os resultados foram comparados com a reação de PCR utilizando iniciadores endereçados para a região espaçadora interna transcritível 1 (ITS-1) dos genes do RNA ribossomal. No grupo de cães vacinados, foi realizada apenas a metodologia para a região ITS-1.

3 JUSTIFICATIVA

O cão é considerado o principal reservatório de *L.(L.) chagasi* e fonte importante de infecção para o vetor, portanto, é fundamental que os cães sejam monitorados rotineiramente. O diagnóstico correto é muito importante para evitar a disseminação da doença ou a eliminação de cães não infectados. Esta medida se constitui em um dos fundamentos para o controle da LV.

As metodologias usualmente utilizadas para o diagnóstico da LVC ainda apresentam deficiências, de forma que, ainda hoje, permanece o desafio para obtenção de um método sensível, específico, simples, rápido e de baixo custo.

A análise clínica apresenta uma dificuldade recorrente relacionada ao fato de vários sinais da enfermidade, no cão, serem muito parecidos com os de outras doenças infecciosas (GRIMALDI; TESH, 1993). Outro problema está no amplo espectro de sinais clínicos apresentados pelos cães. Neste caso, os animais vão de uma faixa de aparentemente saudáveis (assintomáticos) até estágios severos da doença (sintomáticos), perpassando por estágios intermediários com poucos sintomas (oligossintomáticos) (GONTIJO; MELO, 2004).

Os exames parasitológicos baseados em microscopia e cultura de parasitos são laboriosos, demorados, requerem formas invasivas de amostragem e apresentam sensibilidade baixa ou muito variável (SILVA, *et al.*, 2006). A baixa sensibilidade se deve à ocorrência comum de animais assintomáticos e ao fato da distribuição dos parasitos ser heterogênea num mesmo tecido (GONTIJO; MELO, 2004), (IKONOMOPOULOS, *et al.*, 2003), (REITHINGER, *et al.*, 2003).

Os testes sorológicos de diagnóstico estão bem estabelecidos e são de uso mais freqüente. No caso canino, os métodos comumente empregados são a RIFI e a técnica de ELISA. Com a utilização de antígenos brutos, tais técnicas têm apresentado problemas quanto

à especificidade e reprodutibilidade. Melhores resultados têm sido apresentados a partir da utilização de proteínas antigênicas purificadas e/ou recombinantes. No entanto, sua obtenção é, muitas vezes, demorada e requer procedimentos laboratoriais muito sofisticados (TAVARES, FERNANDES; MELO, 2003). Tais métodos têm se mostrado efetivos em detectar leishmaniose ativa na qual grandes quantidades de anticorpos estão presentes nos hospedeiros. No entanto, a eficiência pode diminuir quando essas técnicas são utilizadas em regiões endêmicas onde é comum a existência de animais imunossuprimidos (FISA, *et al.*, 2001). Além do mais, cães sintomáticos usualmente produzem altos níveis de anticorpos que podem ser facilmente detectados (DEPLAZES *et al.*, 1995), mas a sensibilidade da detecção de anticorpos é geralmente baixa em infecções recentes e animais assintomáticos (LEONTIDES *et al.*, 2002). Com isso, pode-se não detectar os baixos níveis de anticorpos presentes nesses animais e resultados falsos negativos podem ocorrer, o que subestima a prevalência da infecção nos cães (SILVA *et al.*, 2001).

Um resultado positivo de RIFI em um cão clinicamente suspeito assume grande relevância. Por outro lado, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção, pois, além da possibilidade da imunossupressão, podem existir alguns animais capazes de desenvolver imunidade celular predominante sobre a imunidade humoral (CABRAL, *et al.*, 1998; PINELLI, *et al.*, 1994). Também é comum que muitos cães desenvolvam resposta imunológica detectável somente algumas semanas depois da infecção (ANDRADE, 2000). Logo, um teste sorológico feito dentro deste intervalo de tempo implica em falso negativo. Existe ainda a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas nos testes RIFI e ELISA com outras enfermidades como doença de Chagas, erliquiose, riquetsiose e toxoplasmose (BARBOSA-DE-DEUS, *et al.*, 2002).

A PCR vem a suprir algumas lacunas importantes presentes nos métodos tradicionais de diagnóstico. Por exemplo, permite detectar, de maneira específica, sequências exclusivas

do genoma do parasito sem necessidade de seu isolamento em cultura. Isso representa mais rapidez para geração de resultados. A PCR vem sendo descrita como um procedimento altamente sensível para a identificação do parasito. Dessa forma, tem sido possível a detecção de infecção em cães antes da soroconversão (STRAUSS-AYALI, *et al.*, 2004) e em animais assintomáticos (LACHAUD, *et al.*, 2002b), (ANDRADE, *et al.*, 2006).

Um dos exemplos de sequências genéticas alvo para a amplificação por PCR são as regiões conservadas de minicírculos de kDNA de *Leishmania*. Tais sequências possuem pelo menos 120 pares de base (FERNANDES, *et al.*, 1996) e apresentam uma grande vantagem: são abundantes, pois chegam a ocorrer em até 10 mil cópias por célula, aumentando a sensibilidade da técnica.

Tem-se demonstrado a ocorrência de cães PCR positivos soronegativos (REALE, *et al.*, 1999), (SOLANO-GALLEGO, *et al.*, 2001). A PCR também se revelou superior à RIFI e à microscopia óptica no diagnóstico em cães independentemente dos órgãos utilizados para retirada de amostras ou das manifestações clínicas presentes nesses animais (ANDRADE, *et al.*, 2006).

A sensibilidade e a especificidade do diagnóstico da leishmaniose por PCR podem ser aumentadas com o uso complementar da hibridização com sondas de DNA marcadas, especialmente com o ^{32}P (DEGRAVE, *et al.*, 1994). Estudos mostram que com esse método é possível reconhecer até 0,1pg do DNA alvo. De uma maneira geral, as técnicas de marcação isotópica de DNA apresentam uma sensibilidade significativamente superior e são mais baratas quando comparadas aos procedimentos convencionais (DAR; KHAN, 2004). Outra vantagem é a simplicidade da detecção do sinal emitido pela radiação. O ^{32}P , por exemplo, emite partículas com energia máxima de 1,7 MeV (TURNER, 1995) o que facilita a leitura

dos resultados pela autorradiografia. Como esse radioisótopo tem meia vida curta de 14,7 dias, seu decaimento é breve o que minimiza o problema da disposição do rejeito radioativo.

Para a realização da PCR não é necessária grande quantidade de material e diferentes amostras clínicas podem ser utilizadas como fonte de DNA. São exemplos os aspirados (esplênicos, de linfonodos e medula óssea), células de cultura, camada leucocitária e sangue coletado em papel filtro (FISA, *et al*, 2001), (TAVARES, FERNANDES; MELO, 2003).

Outro aspecto, muito importante neste contexto, é a utilização de metodologias de amostragens não invasivas, pois pode representar uma alternativa mais simples e não traumática para os animais. Isto, certamente, diminuiria a resistência dos proprietários dos cães em permitir os exames, além de ser uma forma fácil de coleta, podendo ser realizada fora de clínicas veterinárias. Amostras não invasivas, por serem de fácil manuseio, facilitam a reprodutibilidade na técnica de coleta, melhorando a qualidade do diagnóstico, principalmente em triagens em massa podendo ser uma ferramenta valiosa em saúde pública.

Em um trabalho anterior, desenvolvido pelo nosso grupo, foi padronizada a técnica do *swab* conjuntival para a coleta de amostras para a reação de PCR. Neste método um *swab* esterilizado é utilizado para realização de um esfregaço na conjuntiva ocular dos animais. O procedimento é simples, rápido e não invasivo e apresentou uma sensibilidade de 91,3% para cães sintomáticos (FERREIRA *et al.* ,2008). No presente trabalho, avaliamos esta metodologia para cães assintomáticos, grupo em que o diagnóstico é geralmente mais difícil devido à baixa carga parasitária. Avaliamos, ainda, a eficácia do *swab* conjuntival para estimar a prevalência da infecção em um grupo de cães vacinados contra a LVC, no qual um resultado positivo na sorologia pode ser inconclusivo devido à interferência dos anticorpos induzidos pela vacinação. No grupo dos animais assintomáticos a sensibilidade do *swab* conjuntival, técnica de coleta de amostra não invasiva, será comparada com a sensibilidade

obtida em amostras pouco invasivas, sangue e biópsia pele, potencialmente úteis para os levantamentos massivos rotineiros. No grupo dos animais vacinados a sensibilidade do *swab* conjuntival será comparada à obtida pela sorologia.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o *swab* conjuntival como um método de coleta de amostras para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) por PCR em cães assintomáticos e cães vacinados contra a LVC.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar a sensibilidade do *swab* conjuntival na detecção de DNA de *Leishmania* por PCR com as sensibilidades obtidas a partir de amostras de sangue e pele em cães assintomáticos.
- b) Comparar em amostras de *swab* conjuntival, sangue e pele de cães assintomáticos a sensibilidade dos métodos kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR.
- c) Avaliar através do *swab* conjuntival a prevalência da infecção por *Leishmania* em um grupo de cães vacinados.
- d) Comparar a sensibilidade do *swab* conjuntival com a obtida por sorologia no diagnóstico da LVC em grupo de cães vacinados.
- e) Identificar, por RFLP, a partir do método ITS-1 nPCR as espécies de *Leishmania* infectando os cães nos grupos avaliados.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

5.1.1 Cães assintomáticos

Trinta cães assintomáticos com diagnóstico sorológico positivo, destinados à eutanásia, foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Belo Horizonte, Minas Gerais. Apenas animais com exame parasitológico positivo foram utilizados neste estudo. Os cães foram avaliados clinicamente e classificados segundo Mancianti *et al.* (1988).

Seis animais soronegativos de área não endêmica foram utilizados como grupo controle negativo.

5.1.2 Cães vacinados contra a LVC

Quarenta e dois cães da 4ª Companhia do Batalhão de Polícia de Eventos do Comando de Policiamento Especializado da Polícia Militar de Minas Gerais (PMMG) foram utilizados. Os animais são mantidos sobre condições adequadas ao trabalho militar, recebendo alimentação, treinamento e acompanhamento veterinário. Os cães foram avaliados clinicamente e classificados segundo Mancianti *et al.* (1988).

5.1.3 Ética na experimentação animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número 183/2008.

5.2 Coleta de amostras

5.2.1 Sangue

Para amostragem sanguínea foram colhidos aproximadamente 4,0 mL de sangue de cada cão por meio de punção venosa, sendo o material imediatamente acondicionado e homogeneizado em tubos com EDTA. Os tubos foram mantidos no banho de gelo até o processamento.

5.2.2 Biopsia de pele

As biopsias de pele foram coletadas do lado interno da orelha esquerda com o auxílio de um *punch* de 5 mm de diâmetro. As biopsias com massa aproximada de 15,0 mg foram estocadas a -20°C até o momento da extração.

5.2.3 Medula óssea

Os cães assintomáticos foram sedados com associação de xilazina e tiopental. Após atingirem o estado de anestesia profunda, com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha 40 x12 mm, foi aspirado aproximadamente 1 mL de medula óssea do esterno. Após a coleta desse material, os animais foram eutanasiados com injeção letal (endovenosa) de solução de sulfato de magnésio (solução saturada) até a parada cardíaca. Este procedimento foi realizado no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Belo Horizonte.

5.2.4 Swab conjuntival

Após o exame clínico, amostras foram coletadas da conjuntiva inferior de ambas as oculares dos animais. Para o esfregaço foram utilizados *swabs* esterilizados manufaturados para isolamento de bactérias (Figura 5). As extremidades contaminadas dos *swabs* foram separadas e acondicionadas em microtubos de poliestireno esterilizados, livres de

endonucleases com capacidade para 1,5 mL. Estes foram armazenados a -20°C até o momento de uso.

5.3 Exame sorológico

Os exames sorológicos foram realizados por três laboratórios independentes. Laboratórios 1 e 2 (Lab1 e Lab2) foram laboratórios comerciais e o laboratório 3 (Lab3) foi o Laboratório de Referência Nacional para o diagnóstico das leishmanioses humana e caninas da Fundação Ezequiel Dias (Funed). Os três laboratórios usam os mesmos kits de diagnóstico, produzidos por Bio-Manguinhos/ Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e validados pela Funed. Dois testes sorológicos são usados: o ensaio imuno-enzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Em caso de divergência entre o resultado das duas técnicas, a RIFI é usada como teste confirmatório, conforme determinação do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2006).

5.4 Exame parasitológico

A comprovação da infecção foi realizada mediante a demonstração da presença de *Leishmania* em amostras de medula óssea. Para isto, foi feito o exame direto dos aspirados medulares a partir de rigorosa análise de lâminas por microscopia óptica. Este material foi preparado conforme Marques *et al.* (2001).

A mielocultura foi realizada segundo Schuster, *et al.* (2002). Em tubo tipo *Falcon* foi adicionado meio α MEN, acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino inativado, ao qual foram acrescentadas mais 2 gotas de liquemine. Em seguida, em duplicata, foram acrescentados aos tubos aproximadamente 50 μ L de punção de medula óssea. A incubação foi realizada a 26°C em estufa BOD (estufa de demanda bioquímica de oxigênio). Após 7 dias de incubação foi retirada uma alíquota da cultura para leitura em microscópio ótico. Um novo repique foi feito e o procedimento repetido nos dias 14 e 21. As culturas que apresentaram parasitos em um

dos repiques foram consideradas positivas. Quando não foi observada a presença de parasitos em nenhum dos repiques a cultura foi considerada negativa.



Figura 5 - Coleta de amostra pelo método do swab conjuntival. (FERREIRA *et al.*, 2008).

5.5 Extração de DNA

A extração de DNA a partir dos *swabs* foi conduzida de acordo com Ferreira *et al.* (2008). Uma mistura de 300µL de proteinase K (250µg/mL) e Triton X-100 (1%) em tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 50mM e EDTA 10Mm [pH 8,0]) foi adicionada a microtubos de poliestireno esterilizados contendo as extremidades contaminadas artificialmente dos *swabs*. Tais amostras foram incubadas por 2h a 56°C. 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* (PLG-H). Nas duas primeiras lavagens, foram utilizados 75% e 50% de fenol respectivamente e a última foi realizada com 100% de clorofórmio-álcool isoamílico. Após cada lavagem, as misturas foram centrifugadas a 12.000g por 5min. No final, 50µL de acetato de sódio 3M foram adicionados em cada amostra. O DNA foi precipitado com 50µL de isopropanol e foi lavado com 250µL de etanol 75%. Após centrifugação, a fase contendo DNA foi suspendida em água deionizada. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Para a extração de DNA de sangue total foi utilizado o *kit* para purificação de DNA genômico *Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare), onde 1,0mL de sangue foi adicionados 3,0mL de solução de lise celular. Essa mistura foi incubada por 5min a temperatura ambiente para lise de hemácias e centrifugada a 500g por 2min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células sanguíneas suspenso por agitação. A suspensão foi transferida para microtubo de poliestireno de 1,5µL esterilizado e livre de endonucleases. Em seguida foram adicionados, a cada tubo, 20µL de Proteinase K mais 400µL de solução de lise. Os microtubos foram agitados em vortex por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos (com agitações intermitentes em vortex). O lisado foi totalmente aplicado na coluna de ligação e centrifugado a 11000g por 1min. O líquido eluído foi desprezado e a

coluna de purificação reacoplada a um novo tubo coletor. Com 500µL de solução de lise e centrifugação a 11000g por 1min, a coluna de purificação foi lavada a fim de eliminar o restante de proteínas contaminantes. Uma segunda lavagem foi realizada adicionando-se tampão de lavagem na coluna e centrifugar a 11000g por 3min. Logo após, a coluna de purificação foi transferida para um novo microtubo de centrifugação. Por fim, 200µL de tampão de eluição foi acrescido à coluna de purificação que foi incubada por 1min a temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 11000g por 1min para recolher o DNA genômico. O produto de extração foi armazenado a -20°C.

O procedimento para o isolamento de DNA de amostras de punção de medula foi o mesmo empregado para a extração nas amostras de sangue, porém a etapa de lise de hemácias foi suprimida.

O DNA de pele foi extraído com o *kit* de extração Wizard[®] *Genomic DNA Purification* segundo instruções do fabricante. Primeiramente, os fragmentos de biópsia de pele acondicionados em tubos tipo *ependorf* esterilizados, onde receberam 600µL de solução de lise nuclear. As amostras receberam 3,0µL de RNase e foram incubadas a 37°C por 15min. Estas receberam 200µL de solução de precipitação protéica, foram homogeneizadas em vórtex e mantidas em gelo por 5min. As amostras foram então centrifugadas a 14.000g por 8,0min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde recebeu 600µL de isopropanol. Nova centrifugação foi realizada a 14.000g por 1,0min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 600µL de etanol a 70% e centrifugado a 14.000g por 1,0min. Em seguida, removeu-se a fase líquida, secou-se o precipitado a 56°C por 15min e finalmente foram adicionados 100µL de solução de reidratação. O produto final da extração foi então mantido a -20°C até o momento de uso.

5.6 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)

Dois métodos de PCR foram utilizados neste estudo: kDNA PCR- hibridização e o ITS-1 nPCR.

5.6.1 kDNA PCR- hibridização

O método de PCR para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* foi realizado segundo descrito por Degraeve *et al.* (1994). Para sua realização, 1,0µL de cada amostra com DNA purificado foi adicionado a 24µL de uma solução contendo 2,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) a 1,0mM, 0,2nmol de cada oligonucleotídeo iniciador

[5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC-3' e 5'GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3], 2,5 unidades da DNA polimerase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 2,5µL de solução

tampão (Tris-HCl 50mM, [pH 8,3], KCl 50mM), 1,5 µL de MgCl₂ a 1,5 mM e um volume complementar de água deionizada autoclavada. O mesmo foi feito para os controles negativos sem, no entanto, acrescentar DNA. Para os controles positivos, foi adicionado 1,0µL de solução contendo DNA genômico purificado de *L.(L.) chagasi*, cepa MHOM/1973/BH46, na concentração de 1,0ng/µL. As condições para a reação foram: 95°C por 15min para a desnaturação inicial, seguindo-se 30 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 30 segundos a 72°C). Foi realizado ainda um passo para a extensão final a 72°C por 10min. Depois disto, o sistema permaneceu a 4°C.

5.6.1.1 Eletroforese em gel de agarose

Para analisar os produtos de PCR, 5,0µL de tampão de amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v) foram acrescentados a 10µL da amostra e em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de

etídio, em uma diferença de potencial de 90V. Um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100pb foi utilizado e a corrida realizada em tampão TBE 1X.

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

5.6.1.2 Dot Blot e Hibridização

Um total de 10µL dos produtos de PCR foi aquecido a 100°C por 5,0min e resfriados em gelo. A ele foram acrescentados 11µL de solução desnaturante (NaOH 0,4M, EDTA 25mM [pH 8,0]). Em seguida, as amostras foram aplicadas, sob vácuo, a uma membrana de *nylon* utilizando-se o aparelho *Bio Dot (Hybri-dot manifold -BRL®)*. Cada poço recebeu mais 100µL da solução desnaturante e o aparelho foi submetido novamente a um novo ciclo de vácuo. A membrana foi lavada com solução SSC 2X (NaCl 0,3M, citrato de sódio, 0,3mM), deixada secar sobre papel filtro e submetida a luz ultravioleta no aparelho *Stratalinker* para fixação do DNA com energia de 0,12J/cm².

Sondas de minicírculos clonados de *L.(L.) chagasi* foram utilizadas. Estas foram marcadas com ³²P[α]dCTP utilizando-se o método dos iniciadores aleatórios (Invitrogen®). As condições de hibridização foram como descritas por Andrade *et al.* (2001). A membrana de *nylon*, contendo as amostras, foi pré-incubada a 58°C por 30min em solução de leite desnatado 0,5%, sulfato dodecil de sódio (SDS) 1% e SSC 2X. A solução foi trocada utilizando-se um volume suficiente apenas para cobrir a membrana. As sondas marcadas foram adicionadas à solução, após terem sido previamente aquecidas por 3min a 100°C. As membranas foram incubadas por 14h a 58°C com agitação e depois lavadas em solução SSC 0,5X, SDS 0,5% a 65°C por 30min. A membrana foi deixada secar a temperatura ambiente.

Ao final, ela foi exposta ao cassete BAS 2325 (Fujifilm®) por 2h. A imagem foi obtida através do analisador de imagem Bio-Imaging Analyzer (Fujifilm®).

5.6.2 ITS-1 nPCR (Internal transcribed spacer 1 nested PCR)

Utilizamos uma variação do método original descrito por SHÖNIAN *et al*, 2003. Nesta variação o alvo ITS-1, da região dos genes do RNA ribossomal (rRNA), passa por duas ampliações. Na primeira amplificação, 10µL de amostra de DNA foi misturado a 5,0µL de solução tampão 10x (Tris-HCl 50mM [pH 8,3], KCl 50mM), 2,0µL de MgCl₂ a 2mM, 1,0µL de dNTPs a 10mM, 1,4 unidades da enzima DNA polimerase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 15pmol 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 ultrapura autoclavada totalizando um volume final de 50µL.

Uma alíquota de 25µL dos produtos de PCR da primeira amplificação foram diluídos em 1mL de água ultrapura autoclavada, sendo utilizado 10µL dessa solução para amostra de DNA na segunda amplificação. Os demais constituintes da reação foram: 2,5µL de solução tampão 10x, 1,0µL de MgCl₂ a 2mM, 0,5 µL de dNTPs a 10mM, 0,7 unidades da enzima DNA polimerase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 15pmol 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 ultrapura autoclavada totalizando um volume final de 25µL.

Nas duas etapas, as condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C e 30 segundos a 72°C, e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada como descrito na seção 5.6.1.1, mas utilizando um volume de 20µL dos produtos de amplificação de PCR e 5,0µL da

solução tampão de amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% e glicerol 10% v/v). O produto de PCR para a primeira reação deve apresentar 300 a 350pb e o da segunda reação 280 a 330pb. Foi utilizado como controle positivo DNA genômico *L. (L.) chagasi*, cepa MHOM/1973/BH46, e como controle negativo água ultrapura.

5.6.2.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Esta técnica permite a identificação das espécies de *Leishmania*. Os produtos de PCR foram digeridos com *HaeIII*, sem purificação prévia. Para isso, 17µL dos produtos de amplificação da segunda reação do método ITS-1 nPCR foram misturados a 3,0µL de uma solução de digestão contendo 10 unidades da enzima *Hae III* em tampão de enzima (10mM Tris-HCl, 50mM de NaCl, 10mM de MgCl₂, 1,0mM de DTE [pH 7,5]). Os fragmentos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 2% (SIGMA-ALDRICH). A corrida foi realizada a 100V em tampão TBE 0,5x e visualizada em luz ultravioleta após coloração por 15min em brometo de etídio (0,5µg/mL).

Este procedimento foi realizado segundo metodologia utilizada por (SHÖNIAN, 2003). Foram utilizados como controles DNA genômico de *L. (L.) chagasi* (cepa MHOM/1973/BH46), *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903).

5.7 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados, foi utilizado o método o Qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5%. Todas as análises matemáticas foram processadas pelo programa Minitab, versão 15.

6 RESULTADOS

6.1 Cães assintomáticos

6.1.1 PCR kDNA-hibridização

Neste experimento, através do método kDNA PCR-hibridização, foi avaliada a sensibilidade das amostras de *swab* conjuntival em comparação com duas amostras pouco invasivas: biopsia de pele e sangue.

Os produtos de PCR foram submetidos à hibridização com sondas marcadas com ^{32}P . As sondas consistiam de minicírculos clonados de kDNA de *L. (L.) chagasi*. A hibridização aumenta em dez vezes a sensibilidade da técnica (FERREIRA *et al*, 2008) e garante a especificidade evitando que bandas espúrias possam ser erroneamente contabilizadas. Além disso, a etapa de hibridização, permite a identificação do sub-gênero de *Leishmania*.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos a partir de amostras de sangue. Foram verificados 5 cães positivos representando 16,7% do total de animais. A Figura 7 mostra os resultados obtidos a partir de amostras de BP. Neste caso, foram verificados 15 cães positivos que correspondem a 50% do total. Na Figura 8 foram apresentados os resultados obtidos com amostras de SC para as oculares direita e esquerda. Para a ocular direita (Figura 8A) foram obtidas 25 amostras positivas, correspondendo a 83,3% e para a ocular esquerda 23 amostras positivas que representam 76,6%. A positividade obtida, combinando-se os resultados de ambas as conjuntivas foi de 90%, representando 27 animais em um total de 30. Os resultados estão sumarizados na (Tabela 1).

As positivities obtidas com amostras de SC, tanto para a ocular direita quanto para a esquerda foram significativamente superiores as obtidas utilizando-se amostras de BP e S ($p < 0,05$). Por sua vez a sensibilidade das amostras de pele foi superior a obtida com amostras de sangue. ($p < 0,05$).

Embora a conjuntiva direita tenha apresentado um número de amostras positivas superior a ocular esquerda, não houve diferença significativa entre as duas ($p>0,05$).

As amostras dos cães controle negativos foram todas negativas.

6.1.2 ITS-1 nPCR

Neste experimento, o DNA foi amplificado com um conjunto de iniciadores endereçados a região alvo ITS-1 do gene codificador do rRNA. Os produtos da primeira reação foram amplificados com um segundo par de iniciadores (*nested*) amplificando uma região mais interna da região alvo.

A Figura 9 representa os resultados obtidos a partir de amostras de sangue. Foram verificados 17 cães positivos representando 56,6% do total de animais. Na Figura 10 estão representados os resultados obtidos a partir de amostras de pele. Neste caso, foram verificados 15 cães positivos que correspondem a 50% do total. Na Figura 11 são apresentados os resultados obtidos com amostras de *swab* conjuntival, para as oculares direita e esquerda. Para a ocular direita (Figura 11 A) foram obtidas 25 amostras positivas, correspondendo a 83,3% e para a ocular esquerda (Figura 11 B) 20 amostras positivas que representam 66,6%. A positividade obtida, combinando-se os resultados de ambas as conjuntivas foi de 83,3%, representando 25 animais infectados em um total de 30. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

A positividade obtida com amostras de *swab* conjuntival para a ocular direita foi significativamente superior as obtidas utilizando-se amostras de pele e sangue ($p<0,05$). Já os resultados para a conjuntiva esquerda não apresentaram diferença significativa em relação às demais amostras ($p>0,05$). Também não houve diferença significativa entre os resultados das amostras de biopsia de pele e sangue ($p>0,05$).

Os produtos de PCR das amostras positivas de *swab* conjuntival foram digeridos com a enzima *HaeIII*, sem purificação prévia, para identificação das espécies de *Leishmania* pelo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os resultados podem ser visualizados na Figura 12.

Os resultados demonstraram que todos os cães analisados estavam infectados com *L. (L.) chagasi*, com exceção do animal 1 que apresentou perfil característico de infecção por *L. (V.) braziliensis*. O resultado do animal 13 é sugestivo de co-infecção.

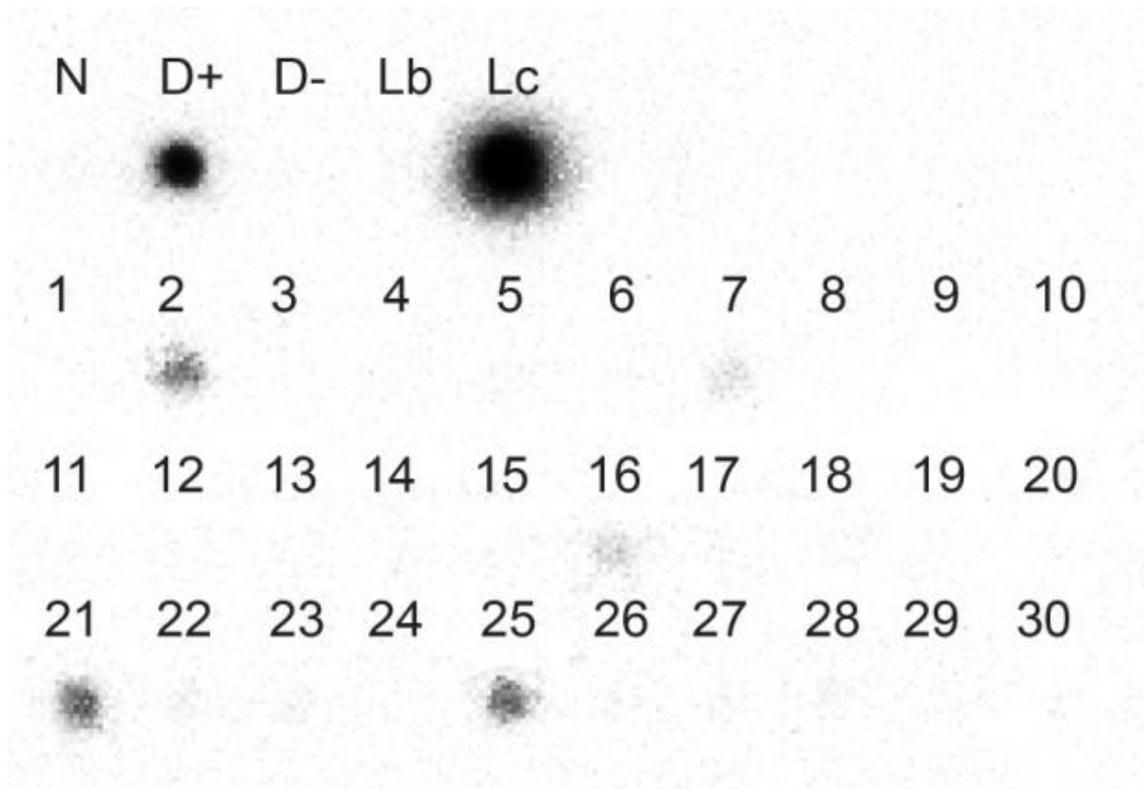


Figura 6 - Autorradiograma de amostras de sangue de cães assintomáticos pelo método kDNA PCR-hibridização.

A hibridização foi realizada utilizando-se sondas marcadas de minicírculos clonados marcados com $^{32}\text{P}[\alpha]\text{dCTP}$. Controle Negativo (N); amostra de cão controle positivo (D+); amostra de cão controle negativo (D-); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); controle positivo de *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903), (Lb); amostras de cães analisadas (1-30). Autorradiograma obtido usando o analisador de imagens *Bio-Imaging Analyzer* (Fujifilm).

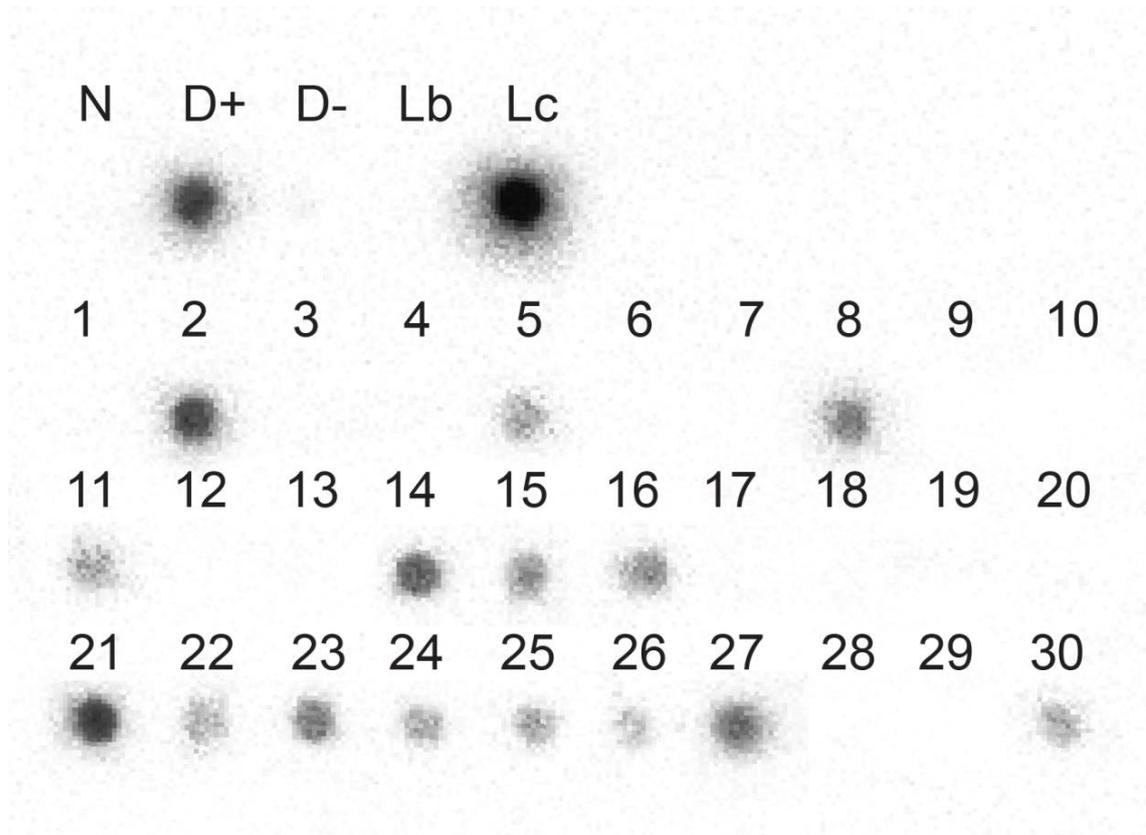


Figura 7 - Autorradiograma de amostras de pele de cães assintomáticos pelo método kDNA PCR-hibridização.

A hibridização foi realizada utilizando-se sondas de minicírculos clonados marcados com $^{32}\text{P}[\alpha]\text{dCTP}$. Controle Negativo (N); amostra de cão controle positivo (D+); amostra de cão controle negativo (D-); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); controle positivo de *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903), (Lb); amostras de cães analisadas (1-30). Autorradiograma obtido usando o analisador de imagens *Bio-Imaging Analyzer* (Fujifilm).

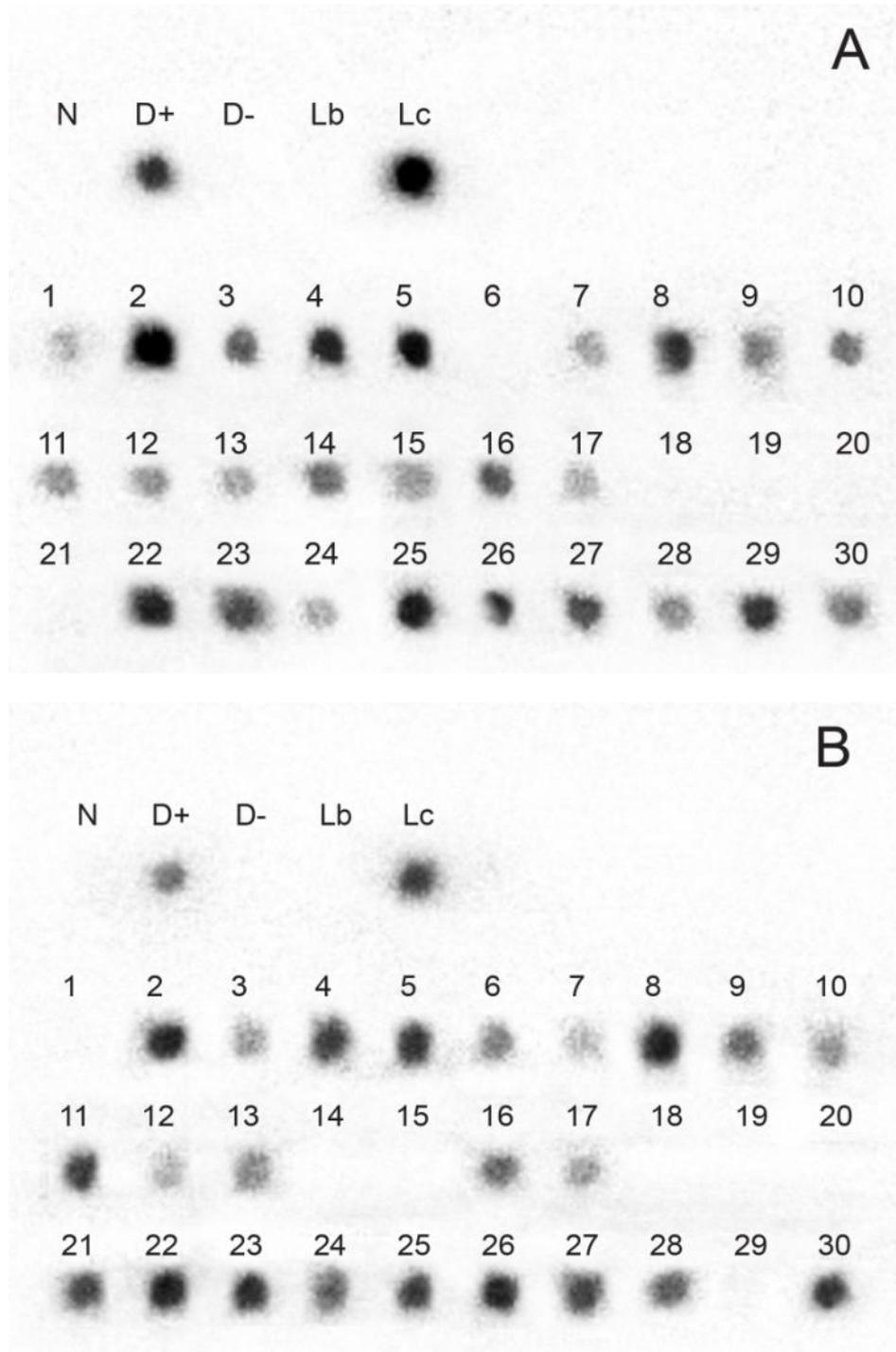


Figura 8 - Autorradiograma de amostras de *swab* conjuntival de cães assintomáticos por kDNA PCR-hibridização.

Conjuntiva direita (A); Conjuntiva esquerda (B). A hibridização foi realizada utilizando-se sondas marcadas de minicírculos clonados marcados com $^{32}\text{P}[\alpha]\text{dCTP}$. Controle Negativo (N); amostra de cão controle positivo (D+); amostra de cão controle negativo (D-); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); controle positivo de *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903, (Lb); amostras de cães analisadas (1-30). Autorradiograma obtidos usando o analisador de imagens *Bio-Imaging Analyzer* (Fujifilm).

Tabela 1 - Resultado das análises realizadas pelo método kDNA PCR-hibridização em amostras de sangue, pele e *swab* conjuntival em cães assintomáticos.

<i>Amostra</i>	<i>Cães</i>																														<i>Total</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30				
S	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	5/30
BP	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	15/30	
SC	<i>D</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25/30	
	<i>E</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	23/30	
	<i>C</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27/30	

Amostra positiva (+); amostra negativa (-); Sangue (S); Biopsia de pele (BP); *Swab* conjuntival (SC); Conjuntiva direita (D); Conjuntiva esquerda (E); Conjuntivas combinadas (C).

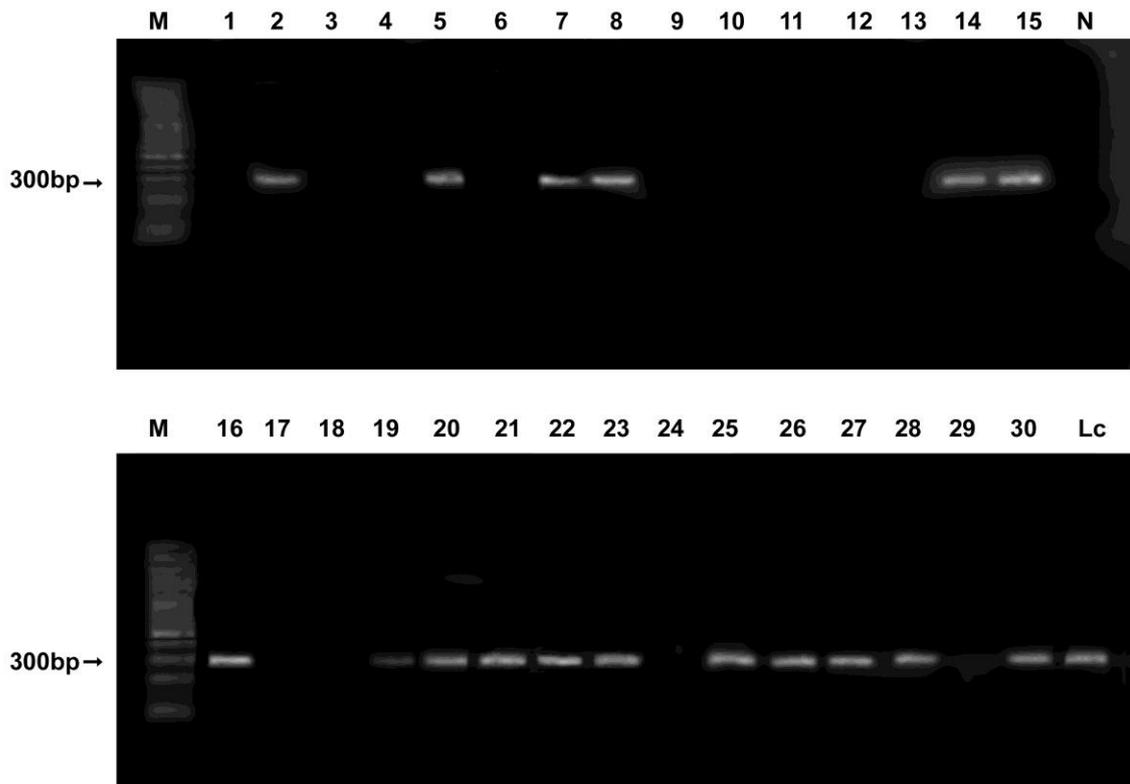


Figura 9 – Amostras de sangue de cães assintomáticos amplificadas pelo método ITS-1 nPCR.

Eletroforese de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio visualizadas em luz ultravioleta. Padrão de Peso Molecular - 100pb (M); Controle Negativo (N); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); amostras de cães analisadas (1-30).

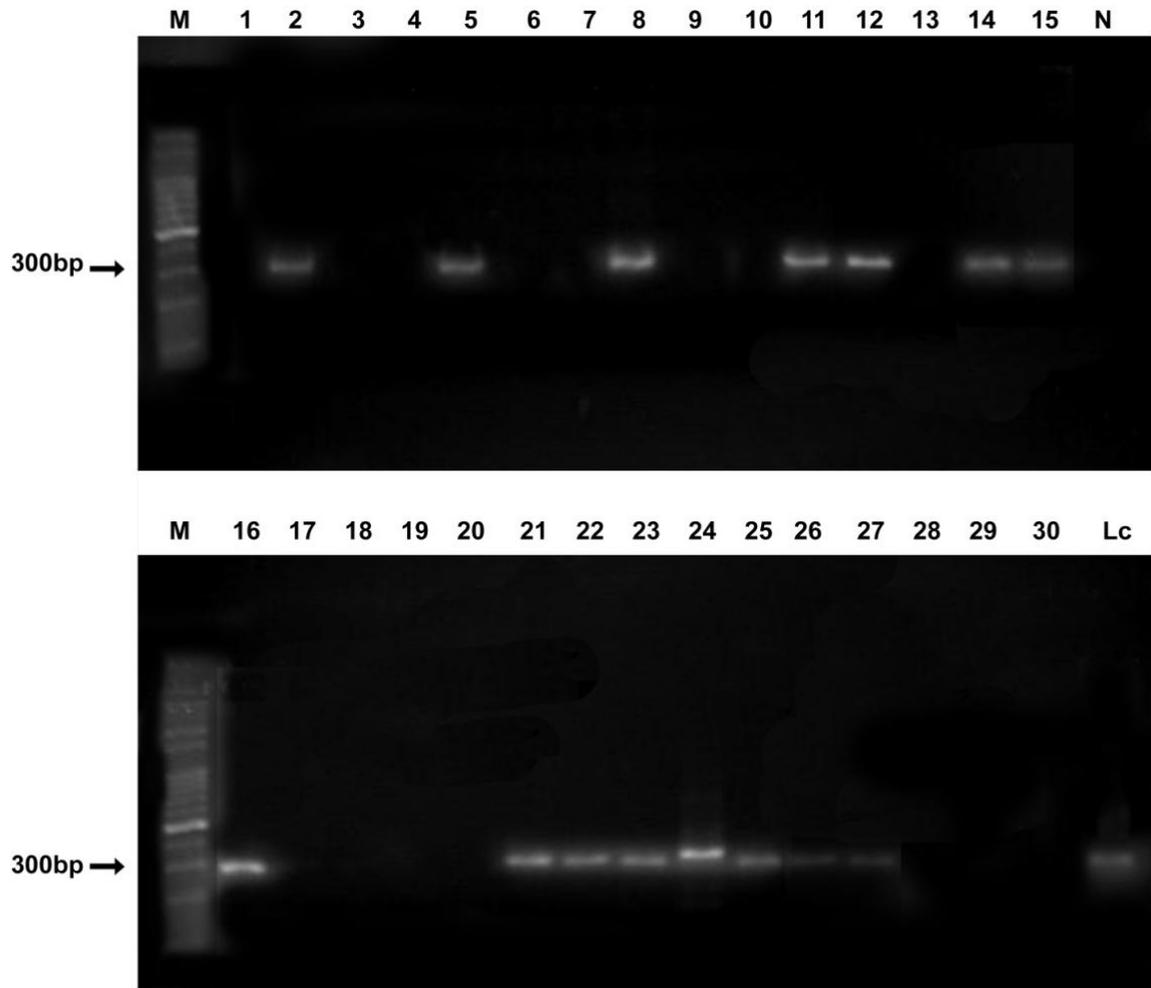


Figura 10 - Amostras de pele de cães assintomáticos amplificadas pelo método ITS-1 nPCR.

Eletroforese de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio visualizadas em luz ultravioleta. Padrão de Peso Molecular - 100pb (M); Controle Negativo (N); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); amostras de cães analisadas (1-30).

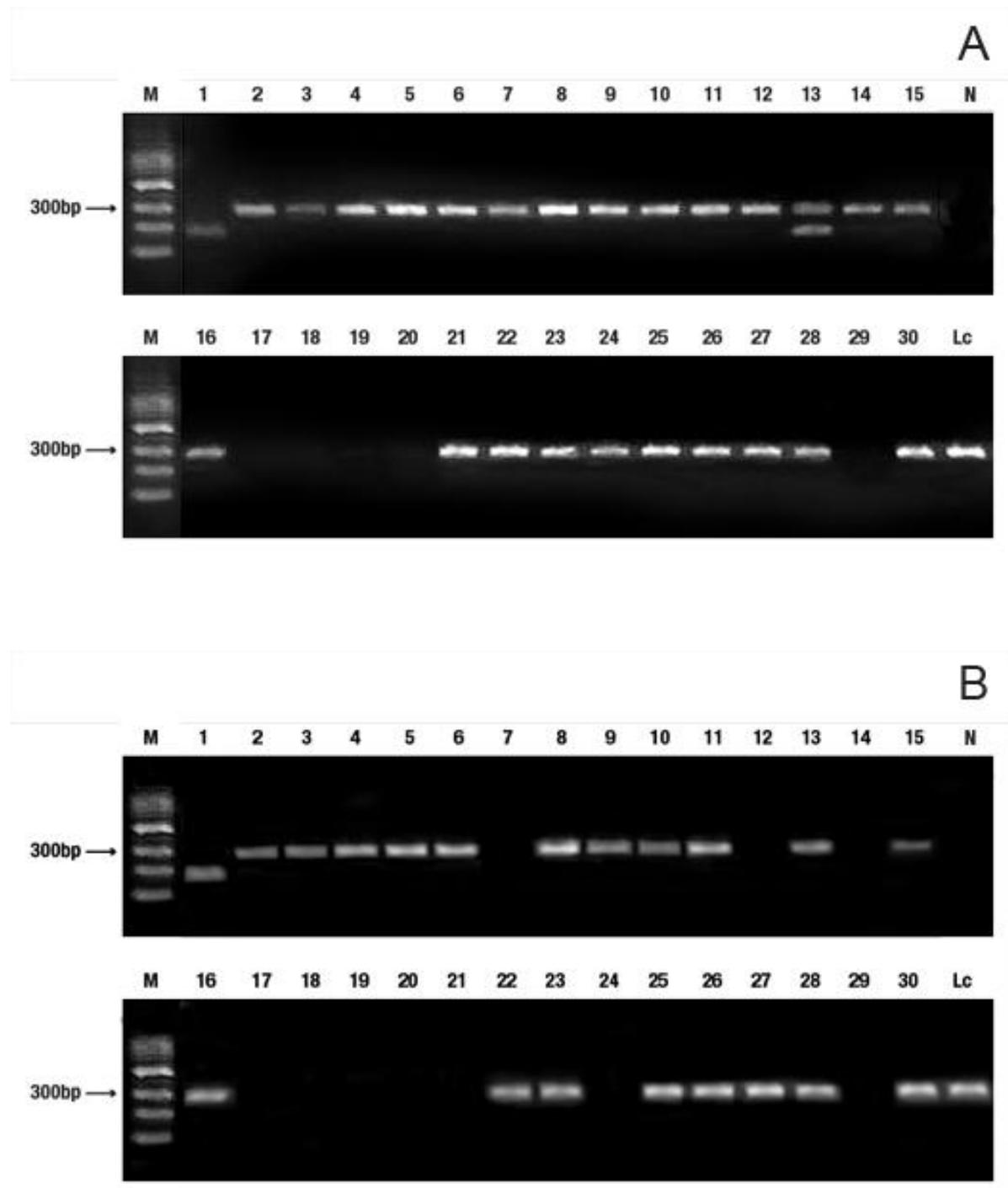


Figura 11 - Amostras de *swab* conjuntival de cães assintomáticos amplificadas pelo método

ITS-1 nPCR.

Eletroforese de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio visualizadas em luz ultravioleta. Conjuntiva direita (A); Conjuntiva esquerda (B). Padrão de Peso Molecular - 100pb (M); Controle Negativo (N); controle positivo de *L.(L.) chagasi* cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); amostras de cães analisadas (1-30).

Tabela 2 - Resultado das análises realizadas pelo método ITS-1 nPCR em amostras de sangue, pele e swab conjuntival em cães assintomáticos.

<i>Amostra</i>	<i>Cães</i>																														<i>Total</i>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
S	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	17/30	
BP	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	15/30	
SC	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	25/30	
	E	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	20/30
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	25/30

Amostra positiva (+); amostra negativa (-); Sangue (S); Biopsia de pele (BP); Swab conjuntival (SC); Conjuntiva direita (D); Conjuntiva esquerda (E); Conjuntivas combinadas (C).

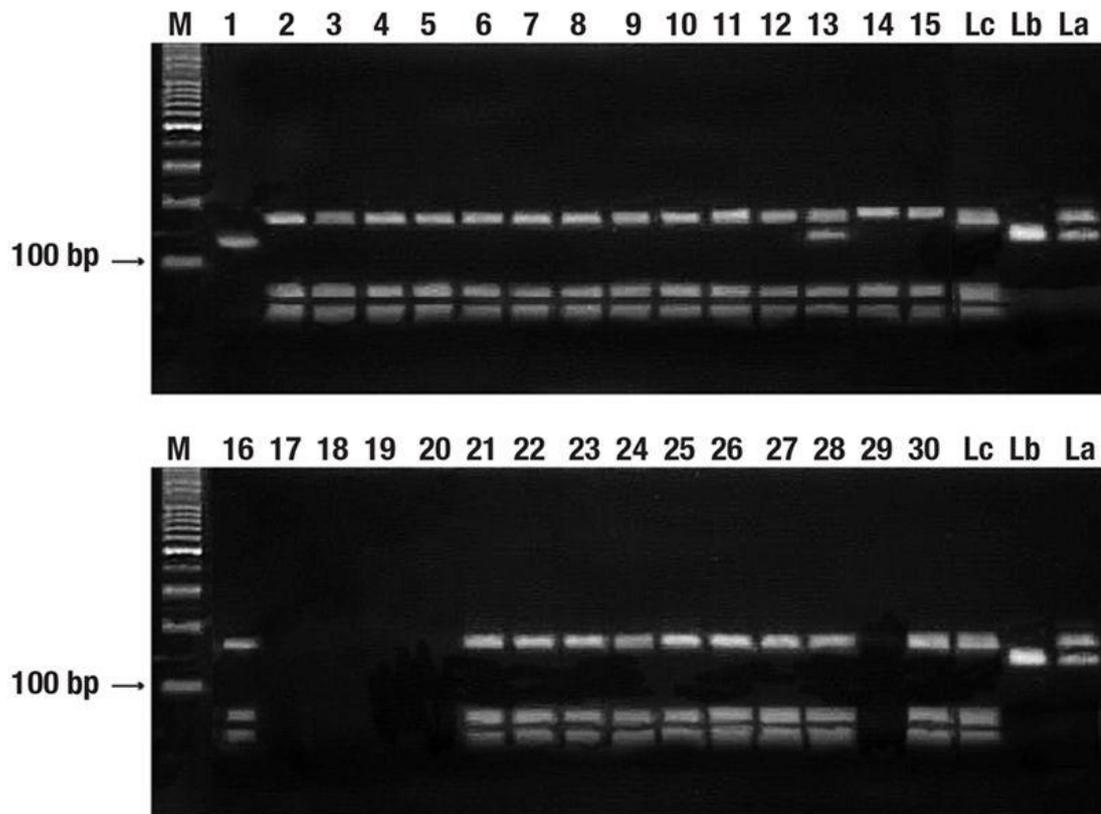


Figura 12 - RFLP de amplicons de ITS-1 nPCR de *swab* conjuntival de cães assintomáticos.

Padrão de peso molecular – 100pb (M); controle *L. (L.) chagasi* (Lc) (cepa MHOM/1973/BH46); *L. (V.) braziliensis* (Lb) (cepa MHOM/BR/1975/M2903); controle *L.(L.) amazonensis* (La) (IFLA/BR/67/PH8); amostras analisadas (1 a 30). A amostra 1 foi identificada como *L.(V.) braziliensis*. Todas as outras foram identificadas com *L. (L.) chagasi*. As amostras 17 a 20 e 29 foram negativas no ITS-1 nPCR.

6.1.3 Comparação entre os métodos kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR

Ao comparar os resultados obtidos para as três amostras analisadas pelos dois métodos, pôde-se observar que em amostras de S a sensibilidade da técnica ITS-1 nPCR (50%) foi surpreendentemente maior ($p < 0,05$) quando comparada com kDNA PCR-hibridização (16,6%).

Em amostras de BP não houve diferença nas análises dos dois métodos em questão ($p > 0,05$). Nos dois casos foi encontrada uma positividade de 50%.

Também nas amostras de SC, não houve diferença significativa para as análises com material das conjuntivas direita e esquerda ($p > 0,05$). A Conjuntiva direita apresentou 25 amostras positivas (83,3%) em ambos os métodos e a conjuntiva esquerda apresentou 23 (76,7%) e 20 (66,7%) amostras positivas para os métodos kDNA PCR-hibridização e ITS-1 nPCR, respectivamente.

Quando aos resultados das conjuntivas direita e esquerda são combinados, não foi verificada diferença significativa na sensibilidade dos dois métodos ($p < 0,05$). A análise com kDNA PCR- hibridização apresentou 90% de positividade e com ITS-1 nPCR 83,3%.

Os resultados comparativos estão sumarizados na Figura 13.

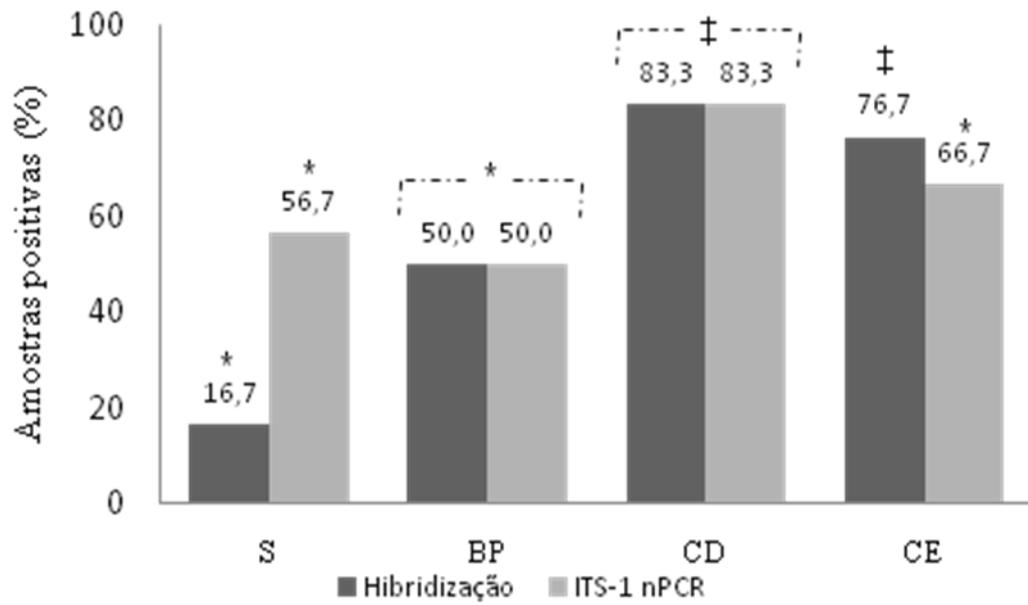


Figura 13 – Comparação das positividade dos métodos kDNA PCR- hibridização e ITS-1 nPCR para as diferentes amostras clínicas.

Positividade de amostras de Sangue (S), biopsia de pele (BP) e *Swab* conjuntival (SC) (CD - conjuntiva direita; CE- conjuntiva esquerda). * $p < 0,05$; ‡ $p > 0,05$.

6.2 Cães vacinados

A triagem sorológica, realizada nos 42 cães, pelo Lab1 apresentou 15 cães reativos e 4 cães foram classificados como indeterminados. Apenas três cães reativos (PM01, PM03 e PM04) e um cão indeterminado (PM08) eram sintomáticos (Tabela 3, 4, e 6). Devido ao número elevado de cães diagnosticados como reativos e indeterminados, novo teste sorológico foi realizado pelo Lab2 nas amostras positivas e indeterminadas do Lab1. O Lab2 encontrou apenas três cães reativos e dois animais foram indeterminados. Devido à baixa concordância entre os resultados do Lab1 e Lab2, todos os animais reativos e indeterminados, de acordo com o Lab1 foram submetidos a contra prova pelo Lab3 (Laboratório de Referência Nacional). O Lab3 confirmou 7 cães reativos e 3 cães foram classificados como indeterminados.

Os cães que foram confirmados como reativos no diagnóstico sorológico da Lab3 foram sacrificados. A necropsia dos animais sacrificados mostrou que órgãos e tecidos apresentavam alterações morfológicas relacionadas com LV, com exceção do animal PM05 que não apresentava nenhuma alteração nos órgãos alvo. As alterações observadas foram baço aumentado e nefrite intersticial (Tabela 3).

O diagnóstico molecular por PCR, utilizando o procedimento do SC, foi realizado em todos os 42 animais e foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* em 17 cães (Figura 14). Comparando os resultados da PCR com os obtidos através do teste sorológico do Lab1, a PCR foi positiva 10 casos reativos e um indeterminado, mas foi negativa para 5 casos reativos e 3 indeterminados. Além disso, a PCR foi positiva em 5 casos não-reativa (cães PM17, PM18, PM21, PM24 e PM27). Os casos reativos, de acordo com o Lab1 que foram negativos na PCR (cães PM13, PM14, PM15, PM25 e PM29), apresentaram resultados negativos nos testes sorológicos dos Lab2 e Lab3, e podem representar casos falsos positivos. O mesmo

ocorreu com os três casos indeterminados do Lab1 que foram PCR negativos (cães PM23, PM28 e PM30).

Para o Lab2, a PCR confirmou todos os 3 casos reativos (cães PM03, PM07 e PM09) e foi positiva para os dois casos indeterminados (cães PM02 e PM04).

Em relação aos resultados obtidos pelo Lab3, a PCR confirmou todos os casos reativos (cães PM01 a PM07) e foi positiva para os três casos indeterminados (cães PM08, PM09 e PM10). O ensaio de PCR confirmou todos os casos, simultaneamente reativos nos testes sorológicos de dois laboratórios (cães PM01, PM02, PM03, PM04, PM05, PM06, PM07 e PM09) (Tabela 3 a 6).

O diagnóstico molecular por PCR utilizando o SC foi capaz de identificar 17 cães positivos, sendo mais sensível que os ensaios sorológicos que identificaram 15 sororreativos no Lab1 (Figura 16).

Os produtos de PCR das amostras positivas de SC foram digeridos com *HaeIII*, sem purificação prévia, para identificação das espécies de *Leishmania* que infectavam os cães, por RFLP.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que todos os animais possuíam infecção por *L. (L.) chagasi*. Os animais PM02 e PM38 apresentaram resultado sugestivo de co-infecção (Figura 15).

Um aspecto interessante verificado neste estudo foi que o diagnóstico molecular identificou um número maior de cães infectados assintomáticos. O diagnóstico sorológico do Lab1 foi reativo para 3 cães sintomáticos e 12 assintomáticos. Três cães sintomáticos e 8 assintomáticos foram simultaneamente positivos nos dois testes.

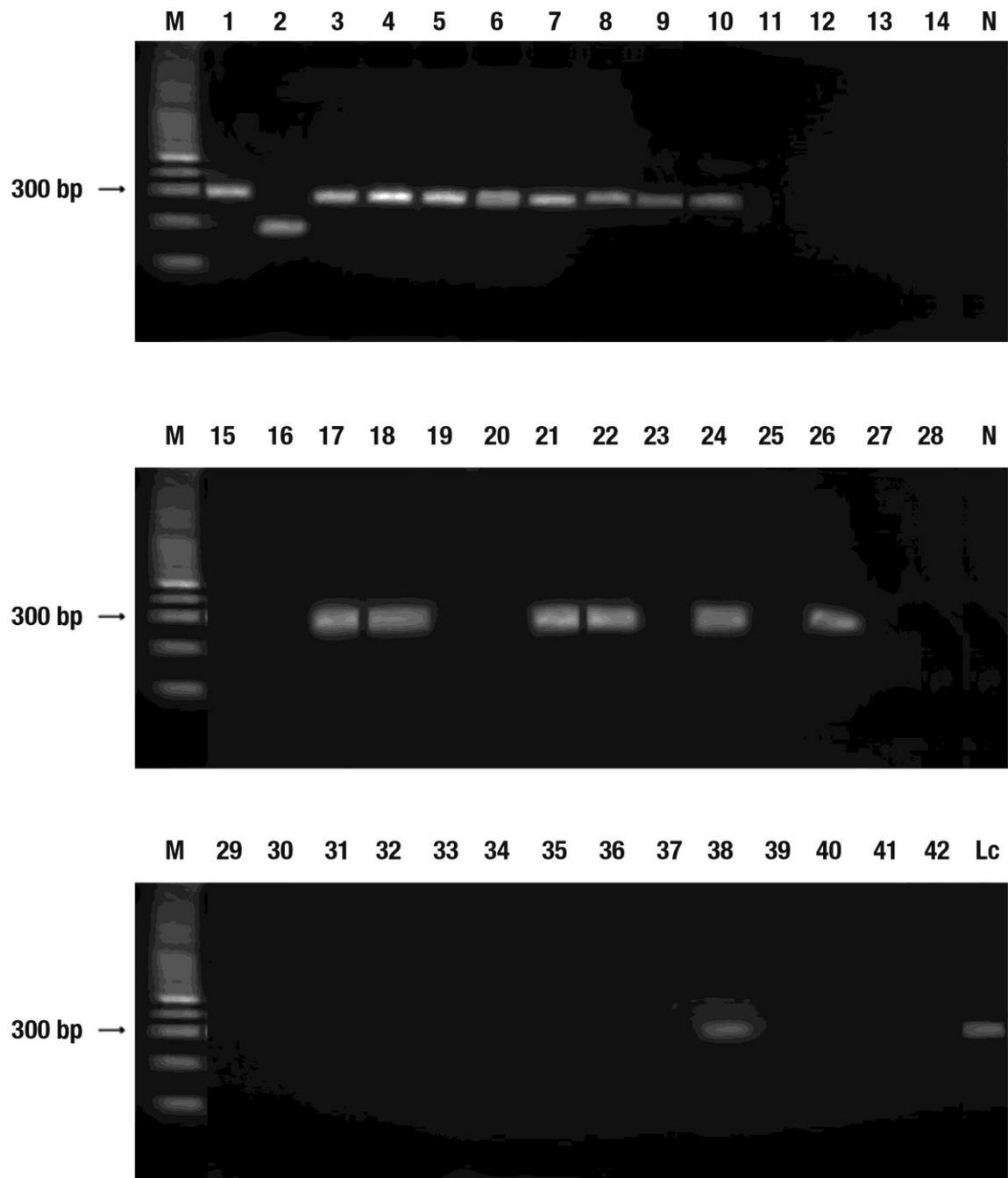


Figura 14 - Análise de *Swab* Conjuntival de cães vacinados pelo método ITS-1 nPCR.

Eletroforese em gel de agarose a 2%. Padrão de Peso Molecular (M); Controle Negativo (N); controle positivo de *L.(L.) chagasi*, cepa MHOM/1973/BH46, (Lc); amostras (1-42). Foram observadas 17 amostras positivas

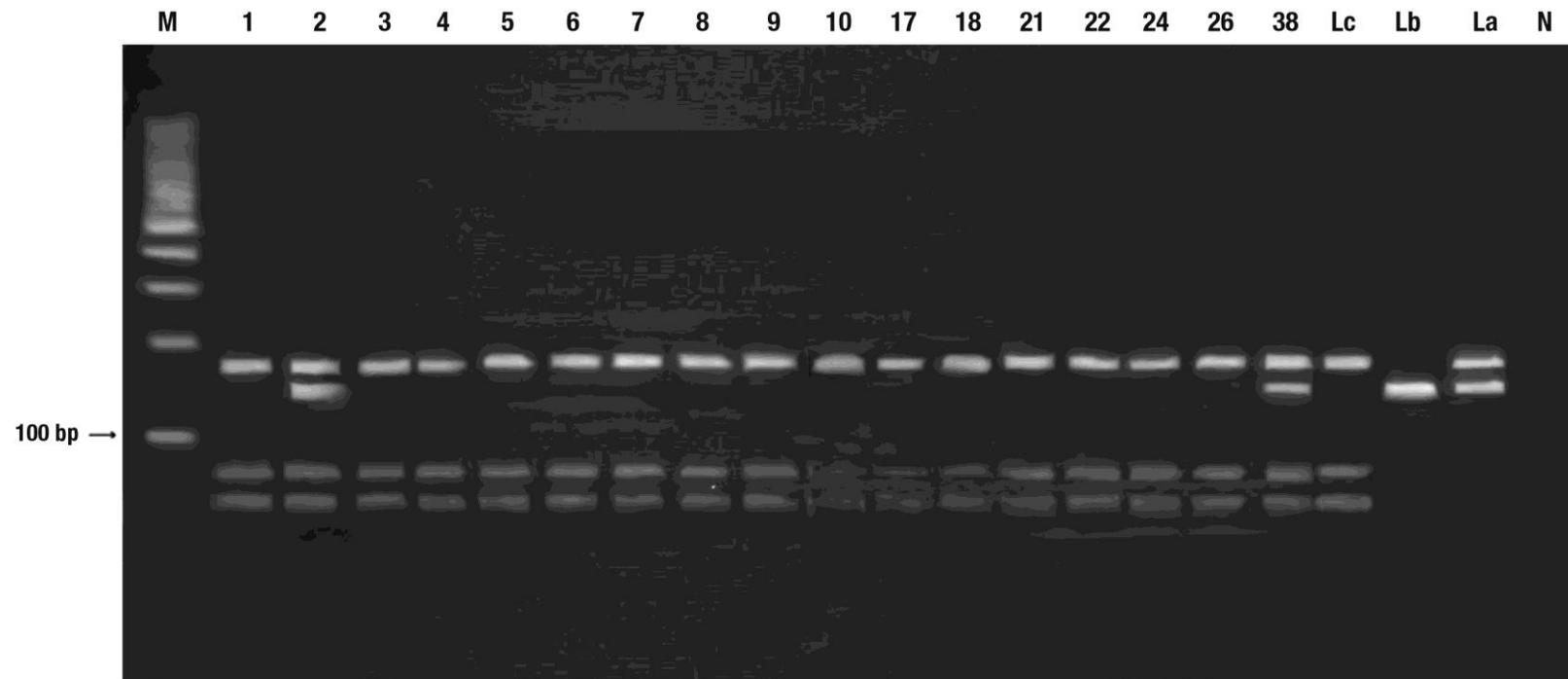


Figura 15 - RFLP de *amplicons* de ITS-1 nPCR dos cães vacinados.

Padrão (M); controle *L. (L.) chagasi* (Lc) (cepa MHOM/1973/BH46); *L. (V.) braziliensis* (Lb) (cepa MHOM/BR/1975/M2903); controle *L.(L.) amazonensis* (La) (IFLA/BR/67/PH8); amostras analisadas (1 a 38). Todas as outras foram identificadas com *L. (L.) chagasi*. Cães 3 e 38 apresentam perfil sugestivo de co-infecção.

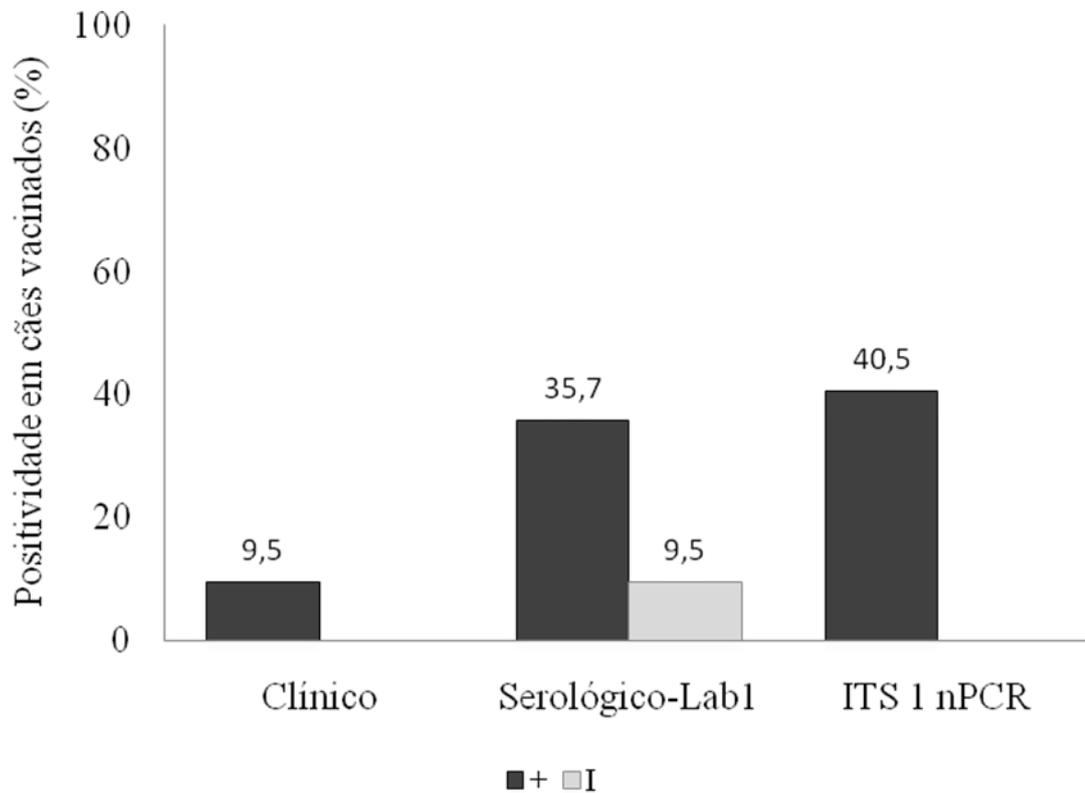


Figura 16 – Comparação das taxas de positividade encontradas nos diagnósticos clínico, sorológico e molecular para um grupo de cães vacinados.

As análises sorológicas foram realizadas em três laboratórios independentes, Lab1, Lab2 e Lab3. Os dois primeiros são laboratórios comerciais e o terceiro é o Laboratório de Referência Nacional. Os laboratórios Lab2 e Lab3 realizaram as análises dos animais que foram reativos e indeterminados nas análises do Lab1. O diagnóstico molecular, por ITS 1 nPCR, foi realizado em todos os 42 animais. Positivo (+); Indeterminado (I)

Tabela 3 – Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM01 a PM07.

<i>Animal</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Diagnóstico</i>					
			<i>Clínico</i>	<i>Sorológico</i>			<i>Molecular</i> <i>ITS 1- nPCR</i>	<i>Dados da necrópsia</i>
				<i>L1</i>	<i>L2</i>	<i>L3</i>		
PM01	M	Pastor Alemão	S	R	NR	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial
PM02	M	Labrador	A	R	I	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial
PM03	F	Pastor Belga de Mallinois	S	R	R	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial
PM04	F	Pastor Belga de Mallinois	S	R	I	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial
PM05	F	Pastor Alemão	A	R	NR	R	+	Nenhuma alteração nos órgãos alvo (fígado, baço e rim)
PM06	M	Pastor Belga de Mallinois	A	R	NR	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial
PM07	M	Pastor Belga de Mallinois	A	R	R	R	+	Baço aumentado, nefrite intersticial

Masculino (M); Feminino (F); Assintomático (A); Sintomático (S); Reativo (R); Não reativo (NR); Indeterminado (I); Positivo (+); Negativo (-).

Tabela 4 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM08 a PM22 .

<i>Animal</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Diagnóstico</i>				
			<i>Clínico</i>	<i>Sorológico</i>			<i>Molecular</i>
				<i>Lab1</i>	<i>Lab2</i>	<i>Lab3</i>	<i>ITS1 - nPCR</i>
PM08	M	Pastor Alemão	S	I	NR	I	+
PM09	F	Pastor Alemão	A	R	R	I	+
PM10	M	Pastor Alemão	A	R	NR	I	+
PM11	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM12	M	Pastor Belga de Mallinois	A	NR	U	U	-
PM13	M	Pastor Alemão	A	R	NR	NR	-
PM14	F	Pastor Alemão	A	R	NR	NR	-
PM15	F	Pastor Alemão	A	R	NR	NR	-
PM16	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM17	F	Pastor Belga de Mallinois	A	NR	U	U	-
PM18	F	Pastor Alemão	A	NR	U	U	+
PM19	f	Pastor Alemão	A	NR	U	U	+
PM20	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM21	M	Labrador	A	NR	U	U	-
PM22	M	Pastor Alemão	A	R	NR	NR	+

Masculino (M); Feminino (F); Assintomático (A); Sintomático (S); Reativo (R); Não realizado (U); Não reativo (NR); Indeterminado (I); Positivo (+); Negativo (-)

Tabela 5 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM23 a PM46 .

<i>Animal</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Diagnóstico</i>				
			<i>Clínico</i>	<i>Sorológico</i>			<i>Molecular</i>
				<i>Lab1</i>	<i>Lab2</i>	<i>Lab3</i>	<i>ITS1 - nPCR</i>
PM23	M	Pastor Alemão	A	I	NR	NR	+
PM24	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM25	F	Pastor Belga de Mallinois	A	R	NR	NR	+
PM26	F	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM27	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	+
PM28	M	Pastor Alemão	A	I	NR	NR	-
PM29	F	Pastor Alemão	A	R	NR	NR	-
PM30	F	Pastor Belga de Mallinois	A	I	NR	NR	-
PM31	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM32	M	Labrador	A	NR	U	U	-
PM33	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM34	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM35	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM36	M	Springer	A	NR	U	U	-

Masculino (M); Feminino (F); Assintomático (A); Sintomático (S); Reativo (R); Não realizado (U); Não reativo (NR); Indeterminado (I); Positivo (+); Negativo (-).

Tabela 6 - Comparação dos diferentes métodos de diagnóstico em animais vacinados PM37 a PM42 .

<i>Animal</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Diagnóstico</i>				
			<i>Clínico</i>	<i>Sorológico</i>			<i>Molecular</i>
				<i>Lab1</i>	<i>Lab2</i>	<i>Lab3</i>	<i>ITS1 - nPCR</i>
PM37	M	Labrador	A	NR	U	U	-
PM38	M	Pastor Belga de Mallinois	A	NR	U	U	+
PM39	F	Labrador	A	NR	U	U	-
PM40	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM41	M	Pastor Alemão	A	NR	U	U	-
PM42	M	Mestiço	A	NR	U	U	-

Masculino (M); Feminino (F); Assintomático (A); Sintomático (S); Reativo (R); Não realizado (U); Não reativo (NR); Indeterminado (I); Positivo (+); Negativo (-).

7 DISCUSSÃO

7.1 Cães assintomáticos

Neste estudo apenas amostras não invasivas (SC) ou pouco invasivas (BP e S) foram comparadas, pois nosso principal objetivo foi escolher métodos de amostragem úteis para levantamentos epidemiológicos em larga escala. Procedimentos invasivos não são adequados para esta finalidade devido à dificuldade de se obter amostras invasivas fora de clínicas veterinárias e a oposição da maioria dos proprietários de cães em permitir os exames.

O SC apresentou sensibilidade superior a obtida em amostras de BP e S. Alguns trabalhos apresentaram resultados satisfatórios para o diagnóstico da LV usando amostras de S (REALE *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2000; IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003, MAIA *et al.*, 2009), embora outros apontam que amostras de sangue frequentemente apresentam problemas relacionados a preparação de DNA e inibição da PCR (REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001; LACHAUD *et al.*, 2002b). Outra desvantagem para o uso de sangue é que a carga parasitária no sangue tende a diminuir ao longo da infecção. Há relatos de bons resultados obtidos a partir de amostras de pele (MANNA *et al.*, 2004; QUARESMA *et al.*, 2009). Este tecido pode ser uma boa opção para o diagnóstico por PCR uma vez que os flebotomos são infectados pela picada na pele de cães. Porém, o inconveniente no uso da pele é que sua coleta é relativamente dolorosa e provoca sangramento.

A sensibilidade obtida neste estudo com SC combinando ambas as conjuntivas, foi similar ao obtido em outros estudos usando SC para o diagnóstico da VL em cães sintomáticos. Strauss-Ayali *et al.* (2004) obteve 92% de positividade usando SC, 65% em BP, 57% em concentrado de leucócitos e 17% usando S. Ferreira *et al.*, (2008) detectou parasitos em 91,7% dos cães usando SC, 30,4% usando sangue em papel de filtro e 21,7% usando S. Pilatti *et al.* (2009) obteve entre 73,9% e 95,6% de positividade em SC, de acordo com o

método de PCR usado. Nossos resultados demonstram que o SC é igualmente efetivo para cães assintomáticos.

A alta sensibilidade em cães assintomáticos destaca este método de amostragem como uma ferramenta promissora para inquéritos de triagem em massa por PCR. Principalmente, em vista da alta prevalência de cães assintomáticos em áreas endêmicas e a baixa sensibilidade de testes baseados na detecção de anticorpos em infecções assintomáticas (Leonides *et al.*, 2002). Além disso, SC é não invasivo, indolor, rápido, de fácil repetição e aceitação por parte dos proprietários de cães.

Dois métodos de PCR foram usados neste estudo: kDNA PCR-hibridização e ITS 1 nPCR. Em estudo anterior (Pilatti *et al.*, 2009), foi demonstrado que a kDNA PCR-hibridização foi significativamente mais sensível que o ITS 1 nPCR. Para compensar a baixa sensibilidade da ITS-1 nPCR, o volume de amostra de DNA usado neste método foi aumentado no presente estudo. Para ITS 1 nPCR foram usados 10,0 µL de amostra de DNA e para PCR-hibridização foi usado 1,0 µL. Nestas condições não foram verificadas diferenças na sensibilidade de ambos os métodos para as amostras de SC e BP. Surpreendentemente, para amostras de S a sensibilidade da ITS-1 nPCR foi significativamente maior (56,7%) que a verificada para PCR-hibridização (13,3%), demonstrando que as sensibilidades dos métodos de PCR podem variar de acordo com o tecido examinado. Além disso, ITS nPCR pode ser uma metodologia alternativa para o diagnóstico molecular em laboratórios que não disponham de pessoal e infra-estrutura para o trabalho com radioisótopos.

7.2 Cães Vacinados

Os ensaios de PCR têm melhorado grandemente a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da infecção por *Leishmania* em cães. Contudo, para tornar esta técnica viável, são

necessários métodos de amostragem não invasivos. O SC apresentou todas estas características associadas a uma alta sensibilidade. No presente estudo, o método de amostragem do SC foi utilizado para a triagem de um grupo de cães militares. Este grupo foi escolhido porque os animais são continuamente monitorados e submetidos a testes sorológicos regulares. Além disso, todos eles são vacinados contra leishmaniose visceral.

O diagnóstico por PCR usando amostras de SC detectou 17 cães infectados demonstrando uma sensibilidade maior que os testes sorológicos realizados pelo Lab1, o qual detectou 15 animais positivos. A PCR foi positiva para 5 animais soronegativos, todos assintomáticos, demonstrando a maior sensibilidade desta técnica e seu potencial para identificação de animais infectados soronegativos.

Os 4 casos sororreativos e os 2 indeterminados obtidos pelo Lab1, que foram PCR negativos, foram também negativos nos testes sorológicos do laboratórios 2 e 3. Todos os casos reativos e indeterminados obtidos pelo Lab3 (Laboratório de Referência Nacional) foram PCR positivos. Estes resultados ressaltam a necessidade de métodos moleculares como ferramentas complementares para um diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina.

Segundo alguns estudos cães vacinados com Leishmune® poderiam apresentar teste positivo em ensaios sorológicos convencionais (Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Oliveira Mendes *et al.*, 2003), tornando estes testes inúteis para os programas de vigilância ou controle envolvendo animais vacinados. Estes estudos usaram o antígeno ligante a fucose manose (FML) na reação de ELISA, o mesmo usado na formulação da vacina Leishmune®. No entanto, um estudo recente demonstrou que usando o lisado total de promastigota de *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*, que são os antígenos presentes no teste ELISA oficial recomendado pelo Ministério da Saude, apenas 1,3% dos cães vacinados apresentaram sorologia positiva (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2009). Nossos resultados

confirmam este estudo, sendo que apenas 15 dos 42 animais vacinados eram positivos no teste realizado pelo Lab1 e 10 deles tiveram a infecção por *Leishmania* confirmada por PCR. Cinco cães poderiam ser classificados como falso positivo, embora não tenham sido reativos nos ensaios sorológicos realizados pelos laboratórios 2 e 3.

Embora os três laboratórios utilizem os mesmos *kits* de diagnóstico oficiais para a realização de ensaios sorológicos, uma diferença significativa nos resultados foi verificada entre eles. Por esta razão apenas os casos confirmados pelo Lab3 (Laboratório de Referência Nacional) foram considerados para eutanásia. Os sete cães confirmados pelo Lab3 foram eutanasiados, 4 deles eram assintomáticos (Tabela 3). Na necrópsia foi observado que todos os animais possuíam baço aumentado e nefrite intersticial, com exceção do cão PM05 que não apresentou nenhuma alteração morfológica relacionada à leishmaniose visceral.

A análise por RFLP mostrou que todos animais estavam infectados por *L. (L.) chagasi*. No entanto, dois animais (PM02 e PM38) apresentaram um padrão de bandas sugestivo de co-infecção. No estudo com cães assintomáticos foi verificado um cão infectado com *L. (V.) braziliensis* (cão 1) e um caso sugestivo de co-infecção (cão 13). Estes resultados confirmam estudos prévios que também encontram animais infectados com *L. (V.) braziliensis* na região metropolitana de Belo Horizonte. Andrade *et al.*(1996) e Quaresma *et al* (2009), identificaram animais infectados com *L.(V.) braziliensis*, porém não observaram cães com RFLP sugestivo de co-infecção.

Este foi o primeiro estudo realizado utilizando-se SC para o diagnóstico da LVC por PCR em cães assintomáticos e em cães vacinados. Nossos resultados demonstraram que SC é um método sensível e superior, em sensibilidade e praticidade, a outras amostras pouco invasivas. Demonstrou-se também o SC permite a realização de diagnósticos confiáveis de

alta especificidade. Concluimos que o uso do CS como ferramenta de diagnóstico por PCR para os inquéritos caninos rotineiros deveria ser seriamente considerado.

8 CONCLUSÕES

- Para o método kDNA PCR-hibridização as amostras de SC, tanto para a conjuntiva direita quanto esquerda, apresentaram sensibilidade significativamente superiores às obtidas com BP e S.
- Para o método ITS 1 nPCR diferença estatística do SC em relação as amostras de BP e S foi verificada apenas para a conjuntiva direita.
- Não há diferença na sensibilidade entre os métodos kDNA PCR-hibridização e ITS 1 nPCR para as amostras de SC e BP quando o volume de DNA, no segundo métodos é 10 vezes maior que no primeiro.
- Nestas condições o método ITS 1 nPCR apresentou sensibilidade superior ao kDNA PCR-hibridização para as amostras de S.
- As sensibilidades dos métodos de PCR testados podem variar de acordo com o tecido examinado;
- Os estudos realizados com cães assintomáticos permitem concluir que SC é um método sensível e superior, em sensibilidade e praticidade, a outras amostras pouco invasivas testadas.
- Os estudos realizados com os cães da Policia Militar permitem concluir que o diagnóstico molecular através do SC apresenta maior sensibilidade que os testes sorológicos.
- O diagnostico molecular via SC foi capaz de identificar animais soronegativos infectados.
- Os testes sorológicos realizados por diferentes laboratórios apresentaram baixa concordância entre si.

- Os cães vacinados contra a LVC não apresentaram reação positiva significativa nos testes sorológicos utilizados.
- Os diagnósticos sorológico e molecular, realizados nos cães vacinados, identificaram uma proporção maior de cães infectados assintomáticos em relação aos sintomáticos.
- A utilização do diagnóstico molecular como ferramenta complementar aos testes sorológicos é recomendada.
- Além de *L. (L.) chagasi* foram identificados cães infectados com *L. (V.) braziliensis* nos grupos avaliados.
- Com base nos resultados obtidos conclui-se que a utilização do SC para os levantamentos caninos massivos rotineiros deveria ser seriamente considerada.
- Os resultados negativos obtidos no grupo de cães controle negativo demonstram a alta especificidade do diagnóstico molecular em discriminar animais positivos e negativos (REMOVER).

9 REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; *et al.* Canine *Leishmaniasis*. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-87, 2004.

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

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. *Leishmaniose visceral canina: transmissão vertical de Leishmania (Leishmania) chagasi e de imunidade em filhotes e alguns aspectos da resposta imunológica em animais adultos*. 126f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

ANDRADE, H.M., *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.* v. 140, n. 3-4, p.231-238, 2006.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.; ZICKER, F. The reemergence of visceral *Leishmaniasis* in Brazil. *Emerg. Infec. Dis.*, v. 2, n.2, 145-146, 1996.

BADARÓ, R. Current situation in regard to *Leishmaniasis* in Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP RESEARCH ON CONTROL STRATEGIES FOR THE *LEISHMANIASIS*, 1988, Ottawa. *Proceedings of an International Workshop held in Ottawa, Canada*. Boca Raton, FL: CRC Press, IDRC-CRDI-CIID: B1-5. 1988. p. 91-100.

BADARÓ, R., *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral *Leishmaniasis*. *J. Infect. Dis.*, v.173, n 3, p. 758-761, 1996.

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.

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.

BORJA-CABRERA, G.P., *et al.* Long lasting protection canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, v. 20, p. 3277-3284, 2002.

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.

CABRAL, M., *et al.* The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 76, p. 173-180, 1998.

COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. Informe técnico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.*, v. 141, p. 1-8, 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.

DAULAIRE, N. Globalization and health. *Development*, v. 4, p. 22-24. 1999.

DAVIES, C.R; REITHINGER, R. Canine *Leishmaniasis*: novel strategies for control. *Trends Parasitol.*, v.18, n.7, p. 289-290, 2002.

DEGRAVE, W., *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo 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.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 97, n. 1, p. 3-15, 2003.

DI LORENZO, C.; PROIETTI, F.A. Leishmaniose visceral canina como fator de risco para a leishmaniose visceral humana: o que sabemos e o que não sabemos ainda. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35 (S3), p. 75 – 81, 2002.

DIETZE, R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. In: CONSULTA DE LOS EXPERTOS OPS/OMS SOBRE *LEISHMANIASIS* VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasilia. *Informe final de la reunion de expertos OPAS/OMS sobre Leishmaniasis en las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p.63-65.

ELKHOURY, A. N.S.M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE LOS EXPERTOS OPAS/OMS SOBRE *LEISHMANIASIS* VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 2005, Brasilia. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis en las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la salud, 2006. p. 24-26.

FERNANDES, *et al.* An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 91, n. 3, p. 279-284, 1996.

FERREIRA *et al.* Evaluation of the conjunctival swab for the canine *Leishmaniasis* diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil *Vet. Parasitology.* *In press.* Doi 10.1016/j.vetpar.2007.12.022

FISA, R., *et al.* Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.*, v. 99, p. 105-111, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, v.2, n.6, 11p, 2002.

GENARO, O., *et al.* Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. *Acta Parasitol. Turcica.* v. 21 (S1), p. 93, 1997.

GOMES, Y.M., *et al.* Diagnosis of canine visceral *Leishmaniasis*: biotechnological advances. *Vet. J.*, v. 31, p. 26-36, 2006.

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.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbial. Ver.*, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUERIN, P.J., *et al.* Visceral *Leishmaniasis*: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* v. 2, p. 494-501, 2002.

IKONOMOPOULOS, J., *et al.* Molecular diagnosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.*, v. 113, p. 99-113, 2003.

LACHAUD, L.; *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral *Leishmaniasis*. *J. Clin. Microbiol.* v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002b.

LUZ, Z.M.P, *et al.* A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 3, p. 249-254. 2001.

MANNA, L., *et al.* Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 125, p. 251-262, 2004.

MARQUES, M.J. *et al.* Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous *Leishmaniasis* via polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 65, n. 6, p. 902-906, 2001.

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

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 26/10/2007 b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leishmaniose visceral*: informações profissionais. Disponível em http://www.portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22139. Acesso em 15/01/2007a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

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 in Parasitol.* v.18, p.399-405, 2002.

NEVES, D. P. *Parasitologia dinâmica*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 495 p.

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.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 18, n. 2, p.293-305, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Contém informações institucionais, notícias técnicas, publicações, projetos e serviços. Disponível em <www.who.int/topics/Leishmaniasis/en/>. Acesso em 19/02/2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Strategic direction for research: *Leishmaniasis*. 2002a. Disponível em <www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>. Acesso em 12/12/2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Weekly epidemiological record*, v. 77, n. 44, p. 365-372. 2002b.

PALATNIK-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.

PINELLI E., *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infec. Immunity.*, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

QUARESMA, P. F., *et. at.* Molecular diagnostic of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*. 2009.

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.* 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.

SANTOS, S.O., *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral *Leishmaniasis*. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 315-317, 1998.

SCHALLIG, H.D.F.H.; OSKAM, L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of *Leishmaniasis* and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health.* v.7, n. 8, p. 641-651, 2002.

SCHUSTER, F. L. and SULLIVAN, J. J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 15. p. 374 – 389, 2002

SHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 349-358, 2003.

SILVA, E.S., *et al.* Visceral *Leishmaniasis* in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285-291. 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 Amarante, RN). *Vaccine*, v. 19, p. 1082-1092, 2001b.

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, n.6, p. 896-898, 2001c.

SINGH, S. New developments in diagnosis of *Leishmaniasis*. *Indian J. Med Res.* v. 123, p. 311-330, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine *Leishmaniasis* endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n.2, p.560-563, 2001.

SOUZA, C.B.P., *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.

STRAUSS-AYALI D., *et al.* Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infec. Dis.*, v. 189, p. 1729-33, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral *Leishmaniasis*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of *Leishmaniasis*. *Expert Rev. Mol. Diag.* v. 3, n. 5, p.657-667, 2003.

TURNER, J.E. *Atoms, Radiation, and Radiation Protection*. 2 ed. New York: JohnWiley, 1995. 557p.

ANEXO A – Artigo aceito em periódico internacional



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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

PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples

Rodrigo Souza Leite^a, Sidney de Almeida Ferreira^a, Leonardo Trindade Ituassu^b,
Maria Norma de Melo^b, Antero Silva Ribeiro de Andrade^{a,*}

^a Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Rua Professor Mário Werneck S/N, Cidade Universitária - Campus da UFMG, 31120-970, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Departamento de Parasitologia, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 September 2009
Received in revised form 14 January 2010
Accepted 13 February 2010

Keywords:
Visceral leishmaniasis
Dog
Diagnosis
PCR
Conjunctival swab

ABSTRACT

The efficacy of conjunctival swab (CS) as a sampling method for visceral leishmaniasis (VL) diagnosis by PCR of asymptomatic dogs was evaluated. The CS was compared to blood samples (B) and skin biopsies (SB), two less invasive samples potentially useful for massive screening of dogs. Thirty asymptomatic dogs, with serological and parasitological positive tests, were used. The samples were analyzed by two PCR methods: kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR. The DNA sample volume used was of 1.0 μ L and 10.0 μ L, respectively. Using CS samples the kDNA PCR-hybridization was able to detect parasite DNA in 24/30 dogs (80%) using the right conjunctiva (RC) and 23/30 dogs (76.6%) with the left conjunctiva (LC), 17/30 dogs (56.7%) by means of SB and 4/30 dogs (13.3%) with B. The CS positivity obtained combining RC and LC results was of 90% (27/30 dogs). The assay of CS samples by ITS-1 nPCR revealed that 25/30 dogs (83.3%) were positive when using RC and 20/30 dogs (66.6%) were positive when using LC. Via the same method 15/30 dogs (50.0%) were positive by SB and 17/30 dogs (56.7%) with B. The CS positivity obtained by ITS-1 nPCR combining RC and LC was of 83.3%. The CS positivities for RC and LC were significantly higher ($p < 0.05$) than SB and B for kDNA PCR-hybridization method. Statistical difference in relation to SB and B was verified by ITS-1 nPCR only for RC. The kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR methods showed similar sensitivities for CS and SB samples. On the other hand, for blood samples, the positivity of ITS-1 nPCR was significantly higher than the one obtained by the kDNA PCR-hybridization, indicating that sensitivity of PCR methods can vary according to the biological sample examined. Our results showed that CS was suitable to detect *Leishmania* DNA in asymptomatic animals when comparing to other low-invasive samples. The CS sensitivities obtained in this study were similar to the ones observed in other studies for VL diagnosis in symptomatic dogs. We concluded that the use of CS for regular screenings of dogs by PCR should be considered.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Leishmania (leishmania) chagasi (syn. *Leishmania (Leishmania) infantum*) is the etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL) in Brazil and dogs are the major domestic reservoir of the parasite (Laison and Shaw, 1987). The VL epidemiological control in Brazil involves the elimination of infected dogs, insecticide treatment and systematic

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3069 3182; fax: +55 31 3069 3380.
E-mail addresses: rleite2005@gmail.com (R.S. Leite),
vidasimio@yahoo.com.br (S.d.A. Ferreira), ltuassu@yahoo.com.br
(L.T. Ituassu), melo@monocict.ufmg.br (M.N. de Melo), antero@cdtn.br
(A.S.R. de Andrade).

27 treatment of human cases (Tesh, 1995). Reliable diagnostic
28 tests for detection of *Leishmania* infection are essential
29 to avoid the disease transmission or the unnecessary
30 culling of dogs. The Brazilian VL control program empha-
31 sizes serologic surveys, mainly using the enzyme-linked
32 immunosorbent assay (ELISA) and the immunofluores-
33 cence antibody test (IFAT), followed by the elimination of
34 the seropositive dogs. However, these techniques present
35 limitations in terms of reproducibility and specificity (Silva
36 et al., 2006). Sometimes they fail due to the low level
37 of specific antibodies in some dogs and cross-reactivities
38 with Chagas's disease, rickettsiosis, ehrlichiosis and tox-
39 oplasmosis (Barbosa de Deus et al., 2002). In addition,
40 symptomatic dogs usually produce high levels of specific
41 antibodies which can be easily detected (Deplazes et al.,
42 1995), but the sensitivity of antibody detection is gener-
43 ally lower in early or in asymptomatic canine infections
44 (Leontides et al., 2002). Asymptomatic animals may represent
45 a high percentage (up to 85%) of infected dogs in areas
46 of endemicity (Dantas-Torres et al., 2006) and they serve
47 as reservoir for vector transmission to susceptible animals
48 and humans (Michalsky et al., 2007).

49 PCR assays have greatly improved the sensitivity of
50 VL diagnosis in dogs (Maia and Campino, 2008). Various
51 canine tissues (including blood, skin biopsies, lymph node,
52 bone marrow and spleen) have been used for PCR detection
53 of the parasite. However, the non-invasive samples assume
54 great importance in this context because they are simpler,
55 painless and more easily allowed by the dog-owners.
56 Non-invasive samplings would represent an essential tool
57 in mass-screening survey for interventional programs. An
58 interesting approach in this context is the conjunctival
59 swab (CS), a method for sample collection that uses a sterile
60 swab for sampling the dog conjunctivas. This method
61 was shown to be highly sensitive when used for diagnosis
62 of symptomatic dogs (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira
63 et al., 2008; Pilatti et al., 2009). The aim of the present
64 study was to evaluate the canine VL diagnosis by PCR using
65 conjunctival swab from asymptomatic dogs.

66 2. Material and methods

67 2.1. Dogs

68 Thirty mongrel dogs, designated to compulsory
69 euthanasia, were donated by the Municipal Zoonotic Dis-
70 eases Control Department of Belo Horizonte, Minas Gerais
71 State, Brazil. The dogs were simultaneously positive for
72 ELISA and IFAT. All dogs were asymptomatic and positive
73 in the parasitological diagnosis. Six healthy serum negative
74 dogs (from a non-endemic area) were used as negative
75 controls. This study was approved by the Animal Experi-
76 mentation Ethics Committee of the Federal University of
77 Minas Gerais (CETEA/UFMG) protocol number 183/2008.

78 2.2. Samples

79 Exfoliative epithelial cells were collected from the right
80 (RC) and left (LC) conjunctiva of each animal using ster-
81 ile cotton swabs manufactured for bacteriological isolation.
82 Each sample was analyzed separately to provide a repli-

83 cate diagnosis for each animal. The cotton tips were broken
84 and only the cotton parts were transferred to sterile tubes
85 and stored at -20°C until use. Peripheral blood (2.7 mL)
86 (B) was collected from each dog in tubes containing EDTA,
87 kept in ice and processed as soon as possible. Skin biopsies
88 (SB) were collected from the internal side of the ear using
89 a 5 mm diameter punch. The biopsies, weighing approxi-
90 mately 15.0 mg were stored at -20°C until processed. Bone
91 marrow aspirates were obtained in a sterile manner using
92 a thin biopsy needle, kept at 4°C and used in the following
93 24 h for parasitological diagnosis.

94 2.3. DNA extraction

95 The DNA purification from CS was carried out as
96 described by Strauss-Ayali (2004), with minor modi-
97 fications. Each cotton received 300 μL of lysis buffer
98 (50 mMol/L Tris, 50 mMol/L NaCl, and 10 mMol/L EDTA, pH
99 8.0) containing proteinase K (250 (g/mL) and Triton X-100
100 (1%). After the incubation (2 h at 56°C) the solution was
101 eluted from the cotton, transferred into phase-lock gel tube
102 PLG-H (Eppendorf) and was mixed with 500 μL of 75% Tris-
103 saturated phenol (Sigma), 25% chloroform-isoamyl alcohol.
104 The organic phase was separated from the aqueous phase
105 by centrifugation at 12,000 $\times g$ for 5 min which was trans-
106 ferred to a new phase-lock gel tube PLG-H. The extraction
107 was repeated with 500 μL of 50% phenol, 50% chloroform-
108 isoamyl alcohol and once with 100% chloroform-isoamyl
109 alcohol. The DNA precipitation was done with one volume
110 of isopropanol-sodium acetate, followed by wash with 75%
111 ethanol. The DNA pellet was suspended in 30 μL of Tris-
112 EDTA buffer (10 mMol/L Tris and 1 mMol/L EDTA, pH 8.0)
113 and was kept at -20°C until being used.

114 The DNA extraction from 1.0 mL of whole blood (B) and
115 skin biopsies (SB) were performed using the commercial
116 kits illustraTM blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Health-
117 care) and Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System
118 (Promega), respectively, according to the manufacturer's
119 protocol. The purified DNA, 80 μL and 160 μL , respectively,
120 was stored at -20°C .

121 2.4. PCR

122 The samples were analyzed by two PCR protocols: kDNA
123 PCR-hybridization and internal transcribed spacer 1 nested
124 PCR (ITS-1 nPCR). Positive control with *L. (L.) chagasi* (strain
125 MHOM/1973/BH46) genomic DNA was used at 1.0 ng/ μL .
126 A negative control without DNA was included in all tests.
127 The DNA sample volume used for kDNA PCR-hybridization
128 was of 1.0 μL and for the ITS-1 nPCR was of 10.0 μL .

129 2.4.1. kDNA PCR-hybridization

130 The PCR reaction mixture contained 0.2 mM
131 of each dNTP, 0.2 nMol of each primer [5'-
132 (G/C)(G/C)(G/C)(G/C)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC-3' and
133 5'-GGGGAGGGCGTCTCGCAA-3'], 2.5 U of AmpliTaq
134 Gold[®] (Applied Biosystems), 2.5 μL of 10X buffer (Tris-HCl
135 50 mM, [pH 8.3], KCl 50 mM), 2.0 mM MgCl_2 in a final
136 volume of 50 μL . The amplifying conditions were: initial
137 denaturation at 95°C for 15 min, 30 cycles including 94°C
138 at 30 s, 50°C at 30 s, 72°C at 30 s, and a final extension at

130 72 °C for 10 min. All amplification products were analyzed
131 on 2% agarose gel and were stained with ethidium bromide.
132 The target for amplification was a 120 base pairs
133 (bp) sequence of *Leishmania* kDNA minicircle conserved
134 region (Degrave et al., 1994).

135 For the hybridization step 10.0 μ L of each amplification
136 product was mixed to 110.0 μ L of NaOH 0.4 M, EDTA
137 25 mM [pH 8.0] solution and spotted on nylon membrane
138 (Hybond-XL Amersham) using a Bio Dot apparatus (Hybrid
139 dot manifold-BRL[®]). After that, the membrane was rinsed
140 with 2 \times SSC (0.3 M NaCl, 0.3 mM sodium citrate) and dried.
141 The DNA was fixed to the filter by UV light (0.12 J/cm²).
142 Cloned kDNA minicircles from *L. (L.) chagasi* were used
143 as probes. The probe was labeled with ³²P[α]dCTP using
144 the Random Primer DNA Labeling System[®] (Invitrogen).
145 Hybridization conditions were as previously described
146 (Andrade et al., 2001). Briefly, the filters were pre-soaked
147 at 58 °C for 30 min in 0.5% non-fat milk, 1% sodium dodecyl
148 sulphate (SDS) and 2 \times SSC solution. The kDNA probe
149 was added to the solution after being heated for 3 min in
150 a boiling water bath. The filters were incubated for 14 h at
151 58 °C, with shaking, then placed in 2 \times SSC at room tempera-
152 ture for 20 min and washed in 0.5 \times SSC, 0.5 \times SDS, at 65 °C
153 for 30 min. Finally, it was dried and exposed in the cassette
154 (BAS 2325 Fujifilm) for 2 h. The image was obtained using a
155 Bio-Imaging Analyzer[®] (Fujifilm).

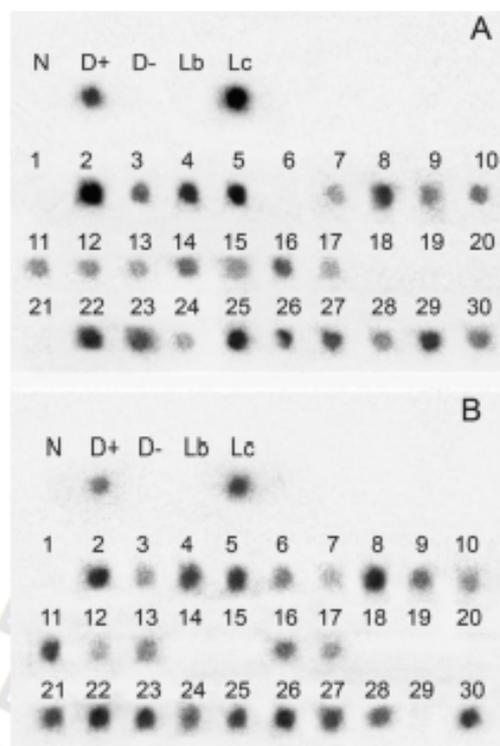
156 2.4.2. ITS-1 nPCR

157 This method was adapted from Schönian et al. (2003).
158 Primers addressed to internal transcribed spacer 1 (ITS-
159 1) between the genes coding for 5.8S rRNA and 5.8S
160 rRNA were used. For the first amplification 10.0 μ L of
161 DNA solution was added to 40.0 μ L of PCR mix contain-
162 ing 15 pMol of the primers 5'-CTGGATCATTTCGGATG-3'
163 and 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' and 0.2 mM deoxynucleo-
164 side triphosphates, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 75 mM
165 Tris-HCl pH 9.0, 2.0 mM (NH₄)₂SO₄, and 1.4 U of Taq DNA
166 polymerase (Ludwig Biotec). The cycling conditions were
167 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s,
168 53 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, followed
169 by a final extension at 72 °C for 5 min. Amplification
170 products were visualized on 2% agarose gel stained with
171 ethidium bromide. The PCR product size stays between
172 300 and 350 bp. For the second amplification 10.0 μ L
173 of a 1:40 dilution of the first PCR product was added
174 to 15 μ L of PCR mix under the same conditions as
175 the first amplification but with the following primers
176 (15 pMol each): 5'-CATTTCCGATGATTACACC-3' and 5'-
177 CGTTCCTCAACGAAATAGG-3'. Positive samples yielded a
178 PCR product between 280 and 330 bp.

179 For the restriction fragment length polymorphism
180 (RFLP) analysis the non-purified PCR products (17 μ L)
181 were digested with 1 U of Hae III enzyme, for 4 h, at 37 °C.
182 The restriction fragments were visualized on 2% agarose gel
183 stained with ethidium bromide.

184 2.5. Statistical analysis

185 The results were analyzed using the Pearson chi square
186 test. The difference between the results was considered
187 significant when $p < 0.05$.



188 Fig. 1. CS samples Autoradiogram. The PCR products were hybridized
189 with *L. (L.) chagasi* cloned kDNA minicircle probes labeled with ³²P for the
190 right conjunctiva (A) and the left conjunctiva samples (B). Negative control
191 (N); Positive control dog (D+); negative control dog (D-); *L. (V.) braziliensis*
192 control (Lb) (strain MHOM/BR/1975/M2903); *L. (L.) chagasi* control (Lc)
193 (strain MHOM/1973/BR146); dogs samples (1–30).

194 3. Results

195 The non-invasive conjunctival swab (CS) was compared
196 with blood (B) and skin biopsies (SB), two other less inva-
197 sive samples potentially useful for massive screening of
198 dogs by PCR. The samples were analyzed by two PCR meth-
199 ods: kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR.

200 Using CS samples the kDNA PCR-hybridization was able
201 to detected parasite DNA in 24/30 dogs (80%) using the right
202 conjunctiva (RC) and 23/30 dogs (76.6%) with the left con-
203 junctiva (LC), 17/30 dogs (56.7%) by means of SB and 4/30
204 dogs (13.3%) with B. The CS positivites for RC and LC were
205 significantly higher ($p < 0.05$) than the positivites obtained
206 for SB and B. The SB showed a significantly higher positiv-
207 ity ($p < 0.05$) than found by the B samples. The CS positivite
208 obtained combining the results of RC and LC was of 90%
209 (27/30 dogs). The CS samples autoradiogram was showed
210 in Fig. 1.

211 The assay of CS samples by ITS-1 nPCR revealed that
212 25/30 dogs (83.3%) were positive when using RC and 20/30
213 dogs (66.6%) were positive when using LC. Via the same
214
215
216

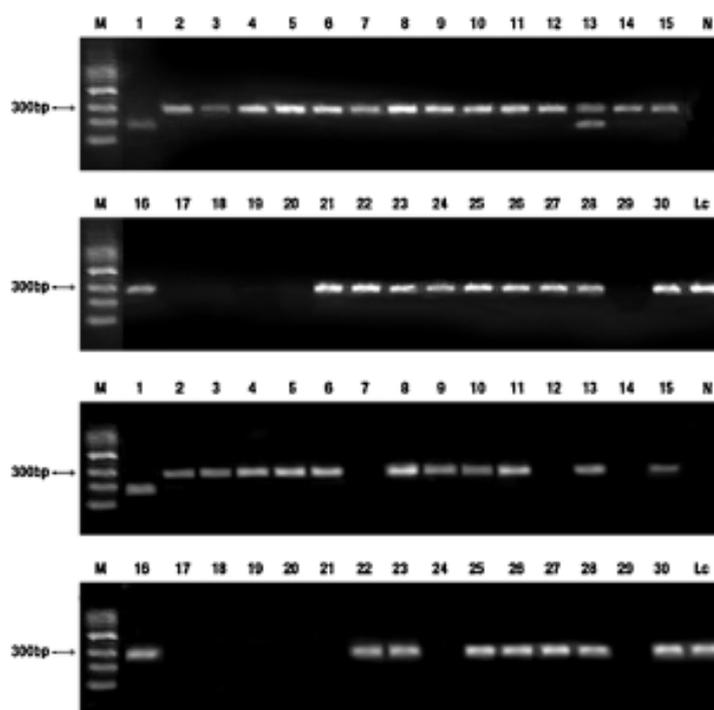


Fig. 2. ITS-1 nPCR analysis of CS samples. Electrophoresis of the ITS-1 nPCR products for the right conjunctiva (A) and the left conjunctiva samples (B). Molecular weight standard (M); negative control (N); *L. (L.) chagasi* control (Lc) (strain MHOM/1973/BH46); dogs samples (1-30).

method 15/30 dogs (50.0%) were positive by SB and 17/30 dogs (56.7%) with B. The CS positivity combining RC and LC was of 83.3%. The CS positivity for RC was significantly higher ($p < 0.05$) than obtained for SB and B samples. However, the CS positivity for LC did not show statistical difference in relation to SB and B ($p > 0.05$). For the ITS-1 nPCR no statistical difference was verified between the positivity of SB and B samples ($p > 0.05$). The ITS-1 nPCR uses two successive rounds of amplifications (nested) using two different groups of primers addressed to internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal rRNA genes. The CS samples electrophoresis by this method were showed in Fig. 2.

The kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR methods showed similar sensitivities for CS (RC and LC) and SB samples. Moreover, for blood samples the positivity of ITS-1 nPCR (56.7%) was significantly higher than the positivity obtained by the kDNA PCR-hybridization (13.3%).

The RFLP analysis of the ITS 1 nPCR positive samples (Fig. 3) showed that the dog 01 was infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In agreement with this result the sample 01 was positive in the PCR step of the kDNA PCR-hybridization method, but negative in the hybridization step with *L. (L.) chagasi* kDNA minicircle probe (Fig. 1). The RFLP profile of sample 13 suggests a case of co infection. All other animals were infected with *L. (L.) chagasi*

(= *L. (L.) infantum*). The six serum negative control dogs were proven negative in the PCR analysis for all samples tested. They were also negative for the parasitological test.

4. Discussion

In the present study only non-invasive (CS) or low-invasive (SB and B) samples were compared since our main objective was to choose a screening method useful for large-scale epidemiological surveys. Invasive procedures are not adequate for this purpose due the difficulty to obtain these samples outside of a veterinary centre and the dog owners' opposition.

Some works have obtained satisfactory results for canine VL diagnosis using B samples (Reale et al., 1999; Hu et al., 2000; Ikononopoulos et al., 2003; Maia et al., 2009), while others point that blood samples frequently presenting problems related to DNA preparation and PCR inhibitors (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001; Lachaud et al., 2002b; Nunes et al., 2007). Another disadvantage of using blood samples is that the parasite load in blood tends to lower in the course of infection. Good sensitivities using skin biopsies have also been reported in some studies (Manna et al., 2004; Quaresma et al., 2009). This tissue may be a good reference for PCR diagnosis since sandflies are infected by

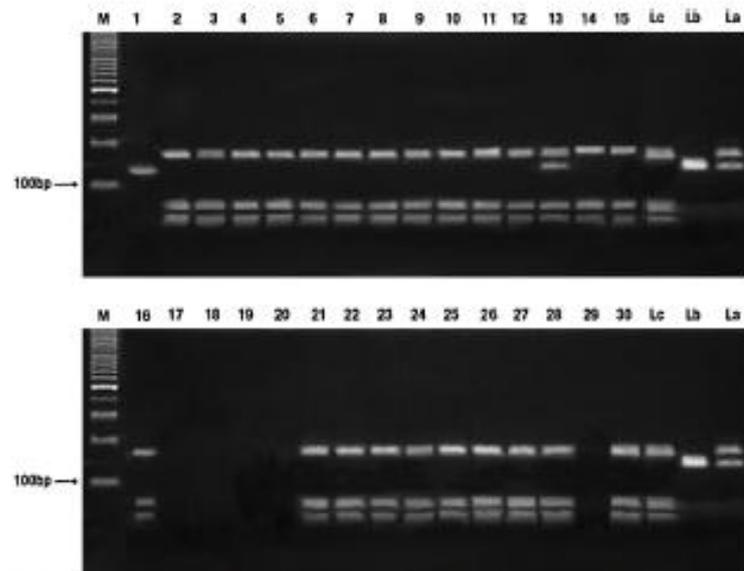


Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism analysis of ITS-1 nPCR amplicons. Molecular weight standard (M); *L. (L.) chagasi* control (Lc) (strain MHOM/1973/BH46); *L. (V.) braziliensis* (Lb) (strain MHOM/BR/1975/M2903); *L. (L.) amazonensis* control (La) (strain IFLA/BR/67/PH8); dogs samples (1–30). The RFLP fragments were of 136 and 123 bp for *L. (V.) braziliensis*; 166 and 122 bp for *L. (L.) amazonensis* and 164, 72 and 35 bp for *L. (L.) chagasi*. The sample 1 was identified as *L. (V.) braziliensis*. All the other dogs were infected with *L. (L.) chagasi*. The RFLP profile of sample 13 suggested co-infection. Samples 17, 20 and 29 were negative for ITS-1 nPCR.

biting the dog skin. However, the drawback of skin biopsies is that it is relatively painful and bloody.

The PCR diagnosis with DNA from CS by the kDNA PCR-hybridization method exhibited a significantly higher sensitivity when compared to the one obtained with SB and B samples. Using ITS-1 nPCR statistical difference in relation to SB and B was verified only for RC. The use of combined results of both conjunctivas is recommended for the better performance of the CS procedure. The sensitivities of 90% (for PCR-hybridization) and 83.3% (for ITS-1 nPCR) obtained in this study using CS samples of both conjunctiva, were similar to the ones observed in other studies, also combining the conjunctivas, for VL diagnosis in symptomatic dogs. Strauss-Ayali et al. (2004) observed 92% of positivity using CS. Ferreira et al. (2008) detected parasite DNA in 91.7% of the dogs using CS. Pilatti et al. (2009) obtained between 73.9% and 95.6% of positivity by CS, depending of the PCR method used. Our results point out that the CS is equally effective for asymptomatic dogs.

The high CS sensitivity in asymptomatic dogs highlights this method as promising tool in mass-screening surveys by PCR, mainly because of the high prevalence of asymptomatic dogs in endemic areas and the lower sensitivity of tests based on antibody detection in asymptomatic infections (Leonides et al., 2002). In addition, CS is non-invasive, painless, fast, easily repeatable and acceptable by the dog owners.

Two PCR methods were used in this work: PCR-hybridization and ITS-1 nPCR. In a previous study Pilatti et al. (2009) demonstrated that the PCR-hybridization was

significantly more sensitive than ITS-1 nPCR. To compensate the lower sensitivity of ITS-1 nPCR, the DNA sample volume used for this method was increased in the present study. For ITS-1 nPCR were used 10.0 µl of DNA sample and for PCR-hybridization 1.0 µl was used. These conditions did not show statistical difference in the sensitivity of both methods for CS and SB samples. Surprisingly, for B samples the sensitivity of ITS-1 nPCR was significantly higher (56.7%) than verified for PCR-hybridization (13.3%), demonstrating that sensitivities of PCR methods can vary according to the biological sample.

This was the first report of CS for VL diagnosis by PCR in asymptomatic dogs. CS is very sensitive method and superior, in sensitivity and practicability, to other low-invasive samples. We concluded that the use of CS for the regular screenings of dogs by PCR must be considered.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CBB-APQ-00399-08) 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.

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 Trop.* 78, 261–267.

- Barbosa de Deus, R., Mares-Guia, M.J., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania major* like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 1356–1361.
- Dantas-Torres, F., Felino de Brito, E.M., Brandão-Filho, P.S., 2006. Seroprevalence survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140, 54–60.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 89, 463–469.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.
- Ferreira, S.A., Ituaçu, 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. *Vet. Parasitol.* 152, 257–263.
- Hu, X.S., Yang, W.T., Lu, H.G., Yan, H.P., Cheng, J.P., Ma, Y., Jin, B.Q., Zhang, T., 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J. Parasitol.* 86, 822–826.
- Ikonomopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gourgoulis, V.G., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* 113, 99–113.
- Lachaud, L., Marcheguy-Hammami, S., Chabbert, E., Deneure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002b. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.
- Laison, R., Shaw, J.J., 1987. Ecology and epidemiology. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 1. Biology and Epidemiology. Academic Press Inc, London, pp. 293–363.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Bilinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* sp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19–27.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J., Gonsalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morici, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, Franca-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, E.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67–76.
- Nunes, C.M., Dias, A.K., Gottardi, F.P., de Paula, H.B., de Azevedo, M.A., de Lima, V.M., Garcia, J.F., 2007. Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples. *Rev. Bras. Parasitol.* 16, 5–9.
- Platts, M.M., Ferreira, A.F., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2009. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res. Vet. Sci.* 87, 255–257.
- Quaresma, F.P., Murta, S.M.F., Ferreira, E.C., da Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P., Gontijo, C.M.F., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real time. *Acta Trop.* 111, 289–294.
- Reale, S., Maia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2931–2935.
- 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. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M., Pinzer, C., Fernandes, O., Brazil, R.P., 2001. Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 806–808.
- Silva, E.S., van der Meide, W.F., Schoone, G.J., Gontijo, C.M.F., Schalling, H.D.F.H., Brazil, R.P., 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* 30, 637–643.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burstein, O., Gönen, I., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1779–1833.
- Tesh, R., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 287–292.

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](#)