ESTELA GALLUCCI LOPES

**Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com
oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e
nuclear de *Leishmania* spp**

SÃO PAULO

2010

ESTELA GALLUCCI LOPES

**Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com
oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e
nuclear de *Leishmania* spp**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
a obtenção de título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2335
FMVZ

Lopes, Estela Gallucci

Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp / Estela Gallucci Lopes. -- 2010.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. *Leishmania* spp. 2. Diagnóstico. 3. Marcadores moleculares. 4. PCR. 5. kDNA.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diagnóstico molecular de *Leishmania spp.* em cães soropositivos para leishmaniose provenientes do Município de Espírito Santo do Pinhal, Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1501/2008, utilizando 75 (setenta e cinco) cachorros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26 de novembro de 2008.

We certify that the Research "Molecular diagnosis of *Leishmania spp.* in dogs seropositives for leishmania infection in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, State of São Paulo", utilizing 75 (seventy five) dogs, protocol number 1501/2008, under the responsibility Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/26/08.

São Paulo, 27 de novembro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LOPES, Estela Gallucci

Título: Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais
Gilberto e Cynthia aos meus irmãos
Denis e Caio e ao meu namorado
Flávio

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela amizade, carinho, pela enorme paciência e por acreditar em mim! (pessoa mais que importante nessa trajetória).

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão sempre atencioso e disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, por me receber em seu laboratório.

A Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Duarte Silva meu mentor do início da jornada.

Ao mestre Carlos Alberto Geraldo Jr, amigo desde do tempo de Pinhal.

A minha “família” VPS Pira, João Augusto Metzner, José Roberto DeVitto (Ni), Cristina, Núbia, e Sr. Antônio Santa Roza por todo carinho, atenção, ajuda e apoio.

Aos queridos amigos Sibele Pinheiro, Vanessa Salgado, Thaísa Sandri, Carol Torres, Daniela Chiebao, Samantha Valadas, Sheila Oliveira, Juliana Martins, Michelle Klein, Marcelinho Nardi, Anaiá Paixão, Guacyara Tenório, Giselle Ayres, Mariana Spolidorio Karen Asano, Karen Ferrari, Simone Passos.

A Prof^a. Lara Borges Keid, pela amizade, carinho e pelo apoio em Pira!

Aos funcionários do VPS São Paulo, Danival, Virginia, Cristina, Tânia, Renatinho, Bispo, Pedrinho e Fininho.

A Janilda por disponibilizar a casa dos residentes em Pirassununga.

Aos meus pais, Gilberto e Cynthia, meus irmãos Denis e Caio por estarem sempre ao meu lado e torcendo por mim.

Ao meu namorado Flávio Zane, pelo amor, carinho e apoio durante o período do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mário Quintana

RESUMO

LOPES, E. G. **Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp.** [Diagnostic attributes of the polymerase chain reaction with *primers* targeted to the kinetoplast and nuclear genome of *Leishmania* spp.]. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A técnica de PCR pode ser empregada para a detecção e identificação de agentes patogênicos e, tem por isso grande aplicabilidade em estudos de epidemiologia molecular. Particularmente no que se refere às infecções por *Leishmania* spp., a detecção do seu agente é de suma importância em animais sorologicamente positivos, no caso de inquéritos para a detecção direta em vetores e em animais de vida livre, cujo anti-soro para provas sorodiológicas, não são disponíveis. A PCR ainda pode oferecer o recurso de identificação molecular do agente em pesquisa, quando marcadores filogeneticamente informativos são amplificados e seqüenciados. Neste sentido, foi realizado o presente trabalho, cujo objetivo foi avaliar o desempenho analítico e diagnóstico de PCRs baseadas em *primers* direcionados a marcadores universais para diagnosticar *Leishmania* spp. localizados em dois genomas da célula parasitária, a saber, kDNA (maxicirculo e minicirculo) e DNA nuclear. Foram avaliadas PCRs baseadas em *primers* direcionados ao (i) DNA de kinetoplasto (kDNA) minicirculo, ao gene codificador de Citocromo B e Citocromo C Oxidase subunidade II presentes no (ii) kDNA maxicirculo, e ao gene codificador Citocromo C, presente no (iii) DNA nuclear. Pelos resultados infere-se que a PCR direcionada ao kDNA de minicirculo apresentou uma sensibilidade analítica muito superior às PCRs direcionadas ao DNA maxicirculo e nuclear. Pelo menos uma combinação dos *primers* de cada marcador foi capaz de detectar DNA de todas as espécies da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), tornando-os uma ferramenta útil para identificação de espécies de *Leishmania* spp. A PCR direcionada ao kDNA de minicirculo apresentou uma sensibilidade diagnóstica também muito superior às PCRs direcionadas ao DNA maxicirculo e nuclear. Amostras de baço e medula óssea produzem informações complementares para diagnóstico *post-mortem* de *Leishmania* spp. em cães soropositivos. Finalmente, as amostras de aspirado de medula óssea demonstraram ser uma alternativa

confirmatória para o diagnóstico laboratorial do agente em animais soropositivos assintomáticos.

Palavras-chave: *Leishmania* spp.. Diagnóstico. Marcadores Moleculares. PCR. kDNA.

ABSTRACT

LOPES, E. G. **Diagnostic attributes of the polymerase chain reaction with primers targeted to the kinetoplast and nuclear genome of *Leishmania* spp.** [Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp]. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The PCR technique can be employed for the detection and identification of pathogens, and therefore has wide application in molecular epidemiology studies. Particularly in relation to infection by *Leishmania* spp., the detection of its agent is important in seropositive animals, in the case of surveys for direct detection in vectors and in free-living animals, whose anti-serum for serodiagnosis test are not available. PCR can also offer the molecular identification of the agent, when phylogenetically informative markers are amplified and sequenced. In this sense, we performed the present study, whose aim was to evaluate the analytical and diagnostic performance of PCR based on universal primers that target markers to diagnose *Leishmania* spp located in two distinct genomes of the parasite cell, namely, kDNA (maxicircle and minicircle) and nuclear DNA. PCRs were evaluated based on primers targeted to the kinetoplastids (i) DNA (kDNA) minicircles, the cytochrome B and cytochrome C oxidase subunit II genes present in the (ii) kDNA maxicircle and the gene encoding Citicromo C, present in (iii) nuclear DNA. Based on the results, the PCR directed to the kDNA minicircle showed an analytical sensitivity much higher than the PCR targeting the kDNA maxicircle and nuclear DNA. At least one combination of primers of each marker was able to detect DNA from all CLIOC - *Leishmania* collection of Oswald Cruz institute species, which qualifies a useful tool for species identification of *Leishmania* spp. The PCR targeted to minicircle kDNA also showed to have a diagnostic sensitivity much higher than PCRs directed to kDNA maxicircle and nuclear DNA. Spleen and bone marrow samples produces additional information post-mortem diagnosis of *Leishmania* spp. on seropositive dogs. Finally, samples of bone marrow aspirate are an alternative for confirmatory laboratory diagnosis of the agent in asymptomatic seropositive animals.

Keywords: *Leishmania* spp.. Diagnostic. Molecular Markers. PCR. kDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eletoforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados pelos <i>primers</i> direcionados aos genes codificadores de citocromo em amostras de DNA extraídas de isolados de <i>L. chagasi</i> – São Paulo – 2010.....	44
Figura 2 -	Eletoforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados pelos <i>primers</i> direcionados Kdna minicírculo. Amostras de medula positivas – São Paulo – 2010.....	49
Figura 3 -	Alinhamento de sequências geradas pelos <i>primers</i> 13A e 13B a partir da amostra 30, mostrando a similaridade da mesma com fragmentos homólogos oriundos de isolados de diversas espécies de <i>Leishmania</i> – São Paulo – 2010.....	51
Figura 4 -	Alinhamento de sequências geradas pelos <i>primers</i> 13A e 13B a partir das amostras 17, 57 e 62, mostrando a similaridade das mesmas com fragmentos homólogos oriundos de isolados de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> – São Paulo – 2010.....	52
Figura 5 -	Reconstrução filogenética de seqüências codificadoras de Citocromo B de <i>Leishmania</i> spp. e outros Trypanossomídeos. Árvore não enraizada inferida por método de distância neighbor-joining com teste bootstrap de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros – São Paulo – 2010.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Coleção de isolados de <i>Leishmania</i> spp do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) – São Paulo – 2009.....	30
Quadro 2 -	Nome, gene alvo e sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> empregados nesse estudo – São Paulo – 2009	32
Quadro 3 -	Dimensões dos produtos amplificados com cada PCR a partir de sequências gênicas de <i>Leishmania chagasi</i> – São Paulo – 2009.....	34
Quadro 4 -	Preparo das diluições seriadas de <i>Leishmania chagasi</i> em meio Schneider, réplica 1 – São Paulo – 2009.	35
Quadro 5 -	Preparo das diluições seriadas de <i>Leishmania chagasi</i> em meio Schneider, réplica 2 – São Paulo – 2009.....	36
Quadro 6 -	Suspensões de baço experimentalmente contaminadas com diluições seriadas de <i>Leishmania chagasi</i> – São Paulo – 2009...	37
Quadro 7 -	Suspensões de medula óssea experimentalmente contaminadas com diluições seriadas de <i>Leishmania chagasi</i> – São Paulo – 2009.....	37
Quadro 8 -	Especificidade analítica das PCRs com as diferentes combinações de <i>primers</i> na detecção de isolados CLIOC – São Paulo – 2009.....	43
Quadro 9 -	Resultado das PCRs nas diluições seriadas (réplica 1) com as melhores combinações de <i>primers</i> de Citocromo B (PCR e <i>Heminested</i> -PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010.....	45
Quadro 10 -	Resultado das PCRs nas diluições seriadas (réplica 2) com as melhores combinações de <i>primers</i> de Citocromo B (PCR e <i>Heminested</i> -PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010.....	45
Quadro 11 -	Resultado das PCRs nas diluições seriadas com suspensão de baço com as melhores combinações de <i>primers</i> de Citocromo B (PCR e <i>Heminested</i> -PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010.....	46
Quadro 12 -	Resultado das PCRs nas diluições seriadas com suspensão de medula com as melhores combinações de <i>primers</i> de Citocromo B (PCR e <i>Heminested</i> -PCR), Citocromo Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010.....	46

Quadro 13 -	Resultado das PCRs direcionadas ao kDNA minicírculo e Citocromo C e <i>Heminested</i> -PCR direcionada ao gene do Citocromo B para detecção de <i>Leishmania</i> spp nos animais naturalmente infectados – São Paulo – 2010.....	48
-------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ETIOLOGIA.....	16
1.2	TRANSMISSÃO.....	17
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
1.4	EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE.....	21
1.5.1	Métodos indiretos	21
1.5.1.1	<i>Teste Intradérmico (reação de Montenegro)</i>	22
1.5.1.2	<i>Reação de aglutinação</i>	22
1.5.1.3	<i>Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)</i>	23
1.5.1.4	<i>Reações imunoenzimáticas (ELISA)</i>	23
1.5.2	Métodos diretos	23
1.5.2.1	<i>Exames Citológicos e histológicos</i>	24
1.5.2.2	<i>Cultivo in vitro (cultura)</i>	24
1.5.2.3	<i>Cultivo in vivo (inoculações em animais)</i>	25
1.5.2.4	<i>Métodos moleculares</i>	25
2	JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	PARASITOS.....	30
3.2	AMOSTRAS DE TECIDOS DE CÃES.....	31
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA DE PARASITOS E DE TECIDOS DE CÃES.....	31
3.4	CONTAGEM DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i>	31
3.5	<i>PRIMERS</i>	32
3.6	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR.....	33
3.7	ELETROFORESE.....	34
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.8.1	Determinação da especificidade analítica das PCRs	34
3.8.2	Determinação da sensibilidade analítica das PCRs	35
3.8.2.1	<i>Preparo das diluições seriadas de Leishmania em meio Schneider</i>	35
3.8.2.2	<i>Preparo das suspensões de baço e de aspirado de medula experimentalmente contaminados com as diluições seriadas de Leishmania chagasi em meio Schneider</i>	36

3.8.3	<i>Desempenho diagnóstico das PCRs</i>	38
3.9	IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	38
3.9.1	<i>Visualização e purificação do produto amplificado</i>	39
3.9.2	<i>Reação de seqüenciamento</i>	39
3.9.3	<i>Precipitação do DNA amplificado</i>	40
3.9.4	<i>Eletroforese de seqüenciamento</i>	41
3.9.5	<i>Análise das seqüências</i>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DAS PCRs.....	42
4.2	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS PCRs.....	44
4.3	DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DAS PCRs.....	47
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRODUTOS DE PCRs.....	49
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE	70

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa de caráter zoonótico, que acomete os seres humanos, animais domésticos e silvestres, causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (NIETO et al., 1999). Sua transmissão é feita por meio de vetores dípteros denominados flebotomíneos, que pertencem a várias espécies do gênero *Lutzomyia* (FEITOSA et al., 2000). É uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo e permanece um desafio para a saúde pública. Está presente na Ásia, África, Europa e nas Américas em mais de 80 países de regiões tropicais e subtropicais. (DANTAS-TORRES et al., 2006; SINGH, 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

A LV possui grande importância, por apresentar alta taxa de mortalidade em humanos infectados quando estes não são diagnosticados precocemente, e não são tratados em tempo hábil (BARROUIN-MELO et al., 2004).

Nos últimos anos, a dispersão da infecção tem sido rápida, novos casos são registrados em áreas consideradas livres da doença e com destaque para regiões urbanas (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009). No Estado de São Paulo a doença está em franca expansão, sendo detectada em 55 municípios paulistas (CAMARGO-NEVES et al., 2007). Os cães exercem um papel fundamental, pois são considerados como o principal reservatório urbano da LV (VERCAMMEN et al., 1997). O sacrifício dos cães soropositivos como instrumento para controle da LV vem gerando grande debate entre a comunidade científica, médicos veterinários, autoridades sanitárias e a comunidade em geral (RIBEIRO, 2005).

1.1 ETIOLOGIA

O parasito causador da LV é um protozoário difásico que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (GREENE, 2006). São organismos flagelados intracelulares obrigatórios, com formatos circulares ou ovais variando de 2 a 5 µm que causam uma infecção generalizada do sistema

fagocitário mononuclear (SFM), localizados no baço, fígado, medula óssea e linfonodos (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Existem descrições de pelo menos 30 espécies dentro do gênero *Leishmania*, distribuídas por várias partes do Velho e do Novo Mundo (GREENE, 2006). As espécies causadoras de leishmanioses na América Latina são divididas em dois grupos taxonômicos (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009). Um dos grupos é o subgênero *Viannia*, que compreende principalmente as espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas ou mucocutâneas (DEGRAVE et al., 1994; LAINSON; SHAW, 2005). O outro é o subgênero *Leishmania*, que compreende as espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localizadas ou difusas, e *L. chagasi*, causadora da LV (DEGRAVE et al., 1994; ASHFORD et al., 1998; LAINSON; SHAW, 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

No Brasil, o gênero mais frequentemente encontrado é a *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e o vetor mais comumente encontrado é *Lutzomyia logipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (ROSA; OLIVEIRA, 1997; BRASIL et al., 2006). As espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são consideradas sinônimas, de acordo com critérios moleculares (MAURICIO et al., 1999; BANETH et al., 2008). Nas Américas, são reconhecidas atualmente onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença em humanos e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil, já foram identificadas sete espécies dermatrópicas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

1.2 TRANSMISSÃO

Os vetores da LV, denominados de flebotomíneos, são pequenos dípteros, de dois a três milímetros de tamanho, corcundas e muito pilosos, com as asas em forma de ponta de lança, mantidas eretas sobre o corpo, quando pousados. No

Brasil são popularmente conhecidos como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira, frebóti etc (CASTRO,1996; MARCONDES, 2001).

A maioria das espécies vive em florestas de vários tipos, cavernas ou cavidade entre pedras, geralmente em condições de alta umidade e de temperatura moderada. Podem invadir domicílios e anexos (CONDINO et al., 1998).

Os machos se alimentam de substâncias açucaradas de excreções de afídeos (pulgões). Já as fêmeas alimentam-se de substâncias açucaradas da seiva de vegetais e também de sangue de vários animais, sendo as responsáveis pela transmissão da leishmaniose (MARCONDES, 2001).

Geralmente as fêmeas picam no crepúsculo ou à noite. A fêmea faz postura de aproximadamente 40 a 70 ovos em local úmido e protegido de luz, contendo matéria orgânica (MARCONDES, 2001) Nas estações de chuvas aumenta a população de *Lu. longipalpis*, o que causa também um aumento da transmissão da leishmaniose (FRANÇA-SILVA et al, 2005). As picadas nos animais ocorrem em áreas com poucos pêlos, como focinhos, orelhas e região genital (MARCONDES, 2001).

O flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula o parasito, na forma promastigota, na derme do hospedeiro vertebrado. Na corrente sanguínea, invadindo as células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), estas se desenvolvem para a forma amastigota, se multiplicando dentro dos macrófagos (RAMOS et al, 1994). Ao picar um animal infectado, o flebótomo ingere e armazena a forma amastigota do parasito, e após seis dias, o parasito já se encontra na forma infectante (promastigota), quando o flebótomo poderá transmitir a doença para outros vertebrados (LAINSON, SHAW, 1987; VICKERMAN; TETLEY, 1990; PENNACCHI; RENDA, 2000). Segundo Freitas (2006), a transmissão de LV também pode ocorrer por transfusão sanguínea e em outro estudo relatado por Coutinho (2005), indica-se a possibilidade da transmissão da *L. chagasi* por carrapatos.

Quando um flebotomíneo ingere as formas amastigotas, estas se diferenciam e se multiplicam por divisão binária em formas promastigotas que são

as formas infectantes, ocorrendo multiplicação em várias partes do tubo digestivo (VICKERMAN; TETLEY, 1990). Ao picar o hospedeiro, serão injetadas as formas promastigotas que estão na probóscida, devido ao bloqueio do proventriculo no tubo digestivo causado pela intensa multiplicação do parasito (MARCONDES, 2001). As formas promastigotas na circulação sangüínea do animal multiplicam-se rapidamente no interior de macrófagos, causando o rompimento destas células, e disseminando o agente para órgãos ricos em células do SFM (NEVES, 2003).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da LV variam assim como o período de incubação, que pode ser de um mês a sete anos (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006). Geralmente cães sintomáticos apresentam febre, emagrecimento, anemia, lesões na pele, alopecia, hepato e esplenomegalia, entre outros sinais (FEITOSA et al., 2000). A infecção causa a produção elevada de imunocomplexos que ficam circulantes até se depositarem nos tecidos. A deposição dos imunocomplexos nos vasos sangüíneos causam as principais complicações da leishmaniose como vasculite, poliartrite, uveíte e glomerulonefrite. (FERRER et al., 1990; SLAPPENDEL, 1998; SÃO PAULO, 2006).

As principais alterações clínico-patológicas na forma aguda são bastante expressivas, como hiperglobulinemia, trombocitopenia, linfopenia e leucocitose com desvio à esquerda. Alterações em concentrações séricas de enzimas hepáticas são comumente reportadas, assim como proteinúria e azotemia. Já animais assintomáticos, condição bastante freqüente em áreas endêmicas, tem pouca ou nenhuma alteração nesses parâmetros (FERREIRA; ÁVILA, 2001; NELSON; COUTO, 2006).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

O tratamento de cães não é recomendado, visto que existem controvérsias em relação à cura parasitológica, apesar da cura clínica. Com efeito, na vigência

de cães sorologicamente positivos recomenda-se a eutanásia humanitária, segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, 2006 (BRASIL, 2006).

A complexidade do agente causal e a adaptabilidade dos vetores aos ecossistemas dificultam as estratégias de controle e profilaxia. Portanto o controle efetivo da doença somente será alcançado com a adoção de programas sistemáticos e simultâneos dentro dos elos da cadeia epidemiológica (CAMARGO et al., 2007).

Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos notificados ocorrem no Brasil (MILES et al., 1999; DESJEUX, 2004).

As principais áreas endêmicas encontram-se na região nordeste do país, do Maranhão até a Bahia e também no Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Espírito Santo e São Paulo (REY, 2001). Atualmente, a LV está registrada em 19 dos 27 estados brasileiros (BRASIL, 2006).

No Estado de São Paulo vem se verificando um processo de expansão da doença, à medida que se verifica adaptação do vetor em zonas urbanas (CAMARGO-NEVES et al., 2002; CAMARGO-NEVES, 2004). Entre os principais responsáveis pelos níveis epidêmicos da LV nos grandes centros destacam-se o estreito convívio entre o homem e os reservatórios, o aumento da densidade do vetor, o desmatamento acentuado, o crescimento desordenado das cidades e o constante processo migratório (DESJEUX, 2004). A devastação de áreas silvestres fez com que os vetores e os hospedeiros silvestres migrassem para o peridomicílio humano em busca de meios de sobrevivência (GONTIJO; MELO, 2004).

A espécie, *Lu. longipalpis*, principal vetor da LV, foi detectada em zona urbana de 68 municípios das regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília, e Presidente Prudente e, mais recentemente, na região de São João da Boa Vista e no município de Espírito Santo do Pinhal (SÃO PAULO, 2006).

O primeiro caso de LV em cães no município de Espírito Santo do Pinhal foi descrito em julho de 2004 e relatado por Geraldo Jr. et al. (2006). O animal apresentava lesões cutâneas, alopecia, hipertermia e onicogribose. O diagnóstico

foi realizado por meio de provas sorológicas, realizadas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz da cidade de São Paulo e por exame histopatológico através de biopsia cutânea (dados não publicados). No ano de 2006, o Centro de Controle de Zoonoses do município de Espírito Santo do Pinhal realizou um inquérito epidemiológico na cidade, quando foram detectados 1080 animais soropositivos. Atualmente o município é considerado pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo como área com presença de transmissão canina da LV (SÃO PAULO, 2007).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE

O diagnóstico da LV, assim como o de outras leishmanioses, constitui-se um desafio para o investigador, devido à grande variedade de sintomas da doença e à grande porcentagem de indivíduos assintomáticos (FERRER et al., 1999).

Outro aspecto relevante em relação ao diagnóstico das leishmanioses diz respeito à especificidade dos métodos laboratoriais tradicionalmente empregados em virtude da diversidade de parasitos encontrados nas regiões brasileiras. Algumas regiões podem ser endêmicas tanto para *L. chagasi*, agente causal da LV, quanto de *L. braziliensis* agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana, ou ainda para *Trypanossoma cruzi* agente da doença de Chagas (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Para o diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp. pode-se valer de métodos indiretos e diretos (FERRER et al., 1999). As principais plataformas diagnósticas comumente empregadas estão descritas a seguir.

1.5.1 Métodos indiretos

Os métodos indiretos para diagnóstico de leishmaniose revelam a presença de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Descreve-se a seguir, os métodos mais empregados no Brasil.

1.5.1.1 Teste intradérmico (reação de Montenegro)

É a prova imunodiagnóstica mais utilizada para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em humanos. Para a LV, a resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* spp. é quase sempre negativa na fase aguda da doença (CASTRO, 1996; CARDOSO et al., 1998). Utiliza-se suspensão de formas promastigotas obtidas a partir de cultura axênica. Os parasitos são lavados e ressuspensos em solução de NaCl 0,9% com 5% de fenol, com uma concentração final de dez milhões de promastigotas por mililitro. Injeta-se, intradermicamente, 0,1 ml desta suspensão a 3 cm da dobra cubital no antebraço dos indivíduos estudados e o resultado é interpretado 48 a 72 horas após a inoculação (JOSE, et al., 2001; REY, 2001).

1.5.1.2 Reação de aglutinação

Este método é citado como alternativo para diagnóstico da LV visceral, em trabalhos comparativos entre ELISA e reação de imunofluorescência indireta. A reação de aglutinação demonstrou ser igualmente sensível e específica (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

É um teste simples e de baixo custo, onde são utilizados parasitos totais ou que são tratados com tripsina e preservados em formalina durante a preparação do antígeno para evitar auto-aglutinação. Nos anos 1980, este teste foi modificado, sendo adicionado à preparação do antígeno o azul brilhante de Coomassie (OIE, 2008), o que possibilitou a visualização de títulos superiores a 51.200. Recentemente, Schoone et al. (2001) desenvolveram um teste rápido de aglutinação (FAST) que detecta anticorpos anti-*leishmania* em amostras de soro ou de sangue total coletadas em papel filtro, em aproximadamente três horas .

1.5.1.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Este método é o preconizado pelo Ministério da Saúde como diagnóstico em inquéritos em populações de cães por demonstrar alta sensibilidade e uma boa especificidade, além de ser um teste de fácil execução, rápido na emissão do resultado e baixo custo (ALVES; BEVILACQUA, 2004)

Utilizam-se as formas promastigotas como antígenos (REY, 2001) fixados em lâmina (FERREIRA; ÁVILA, 2001). As reações cruzadas freqüentemente ocorrem neste método, principalmente com outros tripanossomatídeos (REY, 2001; FERREIRA; ÁVILA, 2001). No trabalho de Mancianti et al. (1996), a RIFI apresentou uma especificidade de 100%, sensibilidade de 98,7% e não apresentou reações cruzadas com outras doenças.

1.5.1.4 Reações imunoenzimáticas (ELISA)

O método ELISA destaca-se pela simplicidade de execução e economia, quando realizado em larga escala. Sua sensibilidade é alta, mas a especificidade é de grupo, podendo revelar reações cruzadas (REY, 2001). Estudos com antígenos definidos vêm sendo usados com vistas a aumentar a especificidade da prova (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Nas investigações sorológicas preconizadas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA), em inquéritos amostrais ou censitários, a prova de ELISA é utilizada como técnica para a triagem, enquanto a RIFI é utilizada nas investigações de foco e para a confirmação das amostras reveladas positivas pelo ELISA (SÃO PAULO, 2006).

1.5.2 Métodos Diretos

Os métodos diretos de diagnóstico são empregados para revelar indícios da presença do parasito em substratos biológicos.

1.6.2.1 Exames citológicos e histológicos

Estas técnicas baseiam-se na observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de aspirados, decalques ou em preparados histológicos de órgãos linfóides como linfonodos, medula óssea, baço e fígado (FERRER et al., 1999). Para a citologia, material proveniente destes tecidos é aspirado, fixado em álcool etílico e corado pelo método de Giemsa ou como alternativa os métodos Wright, Leishman ou Diff-Quick (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Em muitos casos onde os animais são assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes, podem ocorrer resultados falso negativos, sendo necessária a utilização de teste mais sensível como a prova de imuno-histoquímica (GOMES et al., 2006). A vantagem da citologia é a simplicidade de execução, pois o alto grau de contraste obtido entre os parasitos e as células hospedeiras permite diagnóstico consistente da infecção, mesmo quando o número de parasitos é baixo (TAFURI et al., 2004).

Os aspirados do baço (realizados por punção de fluido tecidual com agulha fina e observação em microscópio óptico) assim como a cultura (ver abaixo) representam o principal teste de diagnóstico confirmatório da LV em cães na maioria dos países onde a doença é endêmica (BARROUIN-MELO et al., 2006). O exame citológico tem especificidade elevada. A desvantagem do método é a sua baixa sensibilidade (KOUTINAS et al., 2001).

1.5.2.2 Cultivo *in vitro* (cultura)

Os dois meios de cultura mais usados são o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e o meio de Schneider suplementado por soro fetal bovino (SINGH, 2006).

Para uso como diagnóstico, estes meios são semeados com o material do aspirado de medula óssea, baço, fígado e linfonodos e incubados à temperatura ambiente e depois examinados duas vezes por semana, durante quatro semanas. (FERREIRA; ÁVILA, 2001). O maior inconveniente deste método é a demora para obtenção do resultado (SINGH, 2006).

1.5.2.3 Cultivo *in vivo* (inoculações em animais)

Para o cultivo *in vivo*, materiais biológicos colhidos de animais suspeitos são inoculados em hamsters na região intraperitoneal para o isolamento de cepas viscerotrópicas e na região do focinho e membros, para o isolamento de cepas dermatrópicas. Os sinais provocados por cepas dermatrópicas são exuberantes, com lesões bastante evidentes no local da aplicação, porém aqueles gerados por cepas viscerotrópicas são mais discretos e os sinais são considerados sugestivos de infecção (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Mesmo sendo um método bastante sensível, não é considerado prático para o diagnóstico de rotina, pois pode levar meses para sua conclusão (REY, 2001).

1.5.2.4 Métodos moleculares

O método mais empregado para diagnóstico molecular de leishmaniose é a detecção do DNA do parasito pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Esta prova permite a amplificação seletiva de seqüências do DNA do parasito, o que conseqüentemente viabiliza um instrumento diagnóstico espécie-específico para as doenças infecciosas (DEGRAVE et al., 1994).

A reação da PCR mostra-se muito sensível para detectar casos incipientes (REY, 2001). A PCR pode ser feita com o DNA extraído da medula óssea, biopsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor (FERRER, 1999; IKONOMOPOULOS et al., 2003). A técnica da PCR é bem eficiente para detectar os estágios iniciais de infecções, enquanto as técnicas sorológicas são mais eficazes para diagnosticar estágios avançados da infecção (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Diversos marcadores podem ser usados na PCR para detecção e identificação de *Leishmania* spp., como o gene codificador da menor unidade ribossômica (VAN EYS et al., 1992; ULIANA et al., 1994), o espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) (KUHL et al., 2005; NASEREDDIN et al., 2006;), as seqüências mini-exon (*spliced leader* RNA) (HARRIS et al., 1998; MARFURT et

al., 2003; MAURICIO et al., 2004), genes codificadores de antígenos gp63 e o gene β -tubulin (DA SILVA et al., 2004; TINTAYA et al., 2004; CORTES et al., 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009), seqüências microssatélites (BULLE et al., 2002) e o DNA extra nuclear como os minicírculos de kinetoplasto (kDNA) (RODGERS et al., 1990; RAVEL et al., 1995; REALE et al., 1999; MAHBOUDI et al., 2002; VOLPINI et al., 2004; PENNISI et al., 2005).

Os protozoários da ordem Kinetoplastida, como os dos gêneros *Leishmania* e *Trypanossoma*, além do DNA nuclear, possuem uma massa densa de DNA mitocondrial situada na base do flagelo, denominada cinetoplasto. O cinetoplasto é composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA), as quais são divididas em dois grupos. O primeiro grupo é composto por moléculas grandes, com cerca de 20 a 35kb, denominadas de maxicírculos e estão presentes em cerca de 20-250 cópias por cinetoplasto. O outro grupo é composto por moléculas menores de 0,5 a 1,5kb, denominadas de minicírculos e que se apresentam com cerca de 10.000 cópias por cinetoplasto (LIU et al., 2005; SINGH, 2006; CORTES et al., 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Para a detecção de *Leishmania* spp., o DNA alvo mais empregado são as seqüências de minicírculo do kinetoplasto (kDNA) (MANNA et al., 2004; CORTES et al., 2004; PENNISI et al., 2005; ANDRADE et al., 2006). Estes marcadores possuem uma característica única que possibilita a discriminação de complexos, espécies, subespécies, estirpes e até isolados de *Leishmania* spp., dependendo da região gênica que for pesquisada (GUERIN et al., 2002). Nestes casos, a PCR com estes marcadores mostra-se muito sensível para detectar casos incipientes de leishmaniose, principalmente pelo fato de estes *loci* apresentarem-se em muitas cópias (~10.000 cópias) por célula do parasito (DEGRAVE et al., 1994; NOYES et al., 1998; REY, 2001).

Para o diagnóstico no hospedeiro vertebrado, a PCR pode ser realizada sobre diversos substratos como o DNA extraído da medula óssea, biopsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados (FERRER, 1999; GREENE, 2006).

Em virtude do impacto da LV em Saúde Pública, é indispensável a correta identificação de indivíduos infectados por meio de métodos diagnósticos rápidos e acurados, particularmente para o caso de cães assintomáticos e

oligossintomáticos, importantes elementos da cadeia epidemiológica desta zoonose (LANGONI et al., 2005).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

De acordo com dados epidemiológicos publicados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, o município de Espírito Santo do Pinhal é classificado como “com transmissão canina de leishmaniose visceral” (SÃO PAULO, 2007). Incluem-se nesta categoria aqueles municípios onde tenham sido registrados casos caninos autóctones. Assim sendo, é justificável o inquérito diagnóstico para esta enfermidade em cães provenientes desta área.

De fato, como comentado anteriormente, um inquérito sorológico coordenado pelo serviço de controle de zoonoses da Prefeitura de Espírito Santo do Pinhal indicou soropositividade para leishmaniose em cães do município. Parte dos animais revelados positivos foram eutanasiados e tiveram seus órgãos preservados para pesquisa direta do agente. As amostras recolhidas neste procedimento foram pesquisadas com a metodologia experimental apresentada neste trabalho e cujos objetivos estão explicitados nesta seção.

A técnica de PCR pode ser empregada para a detecção e identificação de agentes patogênicos e, tem por isso grande aplicabilidade em estudos de epidemiologia molecular. Particularmente no que se refere às infecções por *Leishmania* spp., a detecção do seu agente é de suma importância em animais sorologicamente positivos, no caso de inquéritos para a detecção direta em vetores e em animais de vida livre, cujo anti-soro para provas sorodiagnostics, não são disponíveis. Ainda, a PCR pode oferecer o recurso de identificação molecular do agente em pesquisa, quando marcadores filogeneticamente informativos são amplificados e seqüenciados.

Neste sentido, foi realizado o presente trabalho, cujo objetivo foi avaliar o desempenho analítico e diagnóstico de PCRs baseadas em *primers* direcionados a marcadores universais para diagnosticar *Leishmania* spp localizados nos dois genomas distintos da célula parasitária, a saber, kDNA (maxicírculo e minicírculo) e DNA nuclear. Estas PCRs têm potencial aplicabilidade para estudos de epidemiologia molecular por amplificarem regiões filogeneticamente informativas.

Para o marcador localizado em kDNA minicírculo, empregou-se *primers* desenhados por Rodgers et al. (1990). Para os genes de kDNA maxicírculo foram

empregados *primers* direcionados a lócus codificadores de Citocromo B e Citocromo C sub-unidade II. Para DNA nuclear, foram avaliados os *primers* direcionados ao gene codificador de Citocromo C, um produto codificado em DNA nuclear, mas com atividade biológica em mitocôndria.

As PCRs direcionadas aos diferentes alvos mencionados acima foram testadas em diferentes tipos de amostras com vistas aos seguintes objetivos:

- 1) Avaliar o limiar de detecção das diferentes PCRs em suspensões contendo quantidades crescentes de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.
- 2) Avaliar o limiar de detecção das diferentes PCRs em suspensões contendo quantidades crescentes de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e material biológico oriundo de suspensões de baço e aspirado de medula óssea de origem canina.
- 3) Avaliar a capacidade de detecção das PCRs em amostras de DNA oriundas de 15 espécies diferentes de *Leishmania* spp disponíveis em banco de isolados de um laboratório de referência no Brasil.
- 4) Comparar a capacidade de detecção das PCRs em amostras de suspensão de baço e aspirado de medula óssea de cães soropositivos para infecção por *Leishmania* spp., revelados pela Reação de Imunofluorescência Indireta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As seções que seguem contêm informações referentes aos insumos, amostras e delineamento experimental empregados nesta investigação científica.

3.1 PARASITOS

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* spp. cultivadas em meio Schneider acrescidas de soro fetal bovino a 20%. As amostras foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose da Fundação Oswaldo Cruz e pertencem à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Os isolados estão identificados no quadro 1:

Nº	Referência CLIOC	Referência internacional	Identificação da amostra
1	561	MHOM/BZ/1982/BEL21	<i>L. (L.) mexicana</i>
2	565	MHOM/BR/1975/M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>
3	566	MHOM/BR/1975/M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>
4	571	MHOM/SU/1958/STRAIN OD	<i>L. (L.) tropica</i>
5	575	IFLA/BR/1967/PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>
6	1023	MHOM/BR/1981/M6426	<i>L. (V.) lainsoni</i>
7	1365	MDAS/BR/1979/M5533	<i>L. (V.) naiffi</i>
8	1545	MCEB/BR/1984/M8408	<i>L. (V.) shawi</i>
9	2272	MHOM/ET/1967/L82;HV3;LV9	<i>L. (L.) donovani</i>
10	2821	MHOM/IL/1980/FRIEDLIN	<i>L. (L.) major</i>
11	2906	MHOM/BR/2002/LPC-RPV	<i>L. (L.) chagasi</i>
12	2732	MHOM/TN/1993/LV10	<i>L. (L.) infantum</i>
13	582	MCOE/PA/1965/C8	<i>L. hertigi</i>
14	888	MCHO/EC/1982/LSP1	<i>L. equatoriensis</i>
15	579	MHOMBR/1974/PP75	<i>L. (L.) chagasi</i>
16	1245	IGOM/PA/1985/E582.34	<i>L. combiensis</i>

Quadro 1 – Coleção de isolados de *Leishmania* spp. do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) – São Paulo – 2009

3.2 AMOSTRAS DE TECIDOS DE CÃES

Foram empregadas amostras biológicas de 72 cães com sorodiagnóstico positivo para Leishmaniose, oriundos do município de Espírito Santo do Pinhal, estado de São Paulo. A condição sorológica dos animais foi revelada por exames realizados pelo Instituto Adolfo Lutz, empregando-se a RIFI.

Os animais deste estudo foram recolhidos e eutanasiados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de Espírito Santo do Pinhal como parte do programa de controle da Leishmaniose desta área. Este evento ocorreu em Junho de 2006.

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia nos laboratórios da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIPINHAL quando foram recolhidas amostras de aspirado de medula óssea e de fragmento de baço. As amostras foram acomodadas em microtubos plásticos de 1,5 mL e estocadas a -20°C.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE PARASITOS E DE TECIDOS DE CÃES

Para extração de ácidos nucléicos foi empregado lise celular com proteinase K e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) seguido de purificação com uso de Fenol/Clorofórmio/Álcool-Isoamílico. Os protocolos para cada tipo de amostra encontram-se detalhados no apêndice A.

3.4 CONTAGEM DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* spp.

A fase líquida dos tubos contendo as formas promastigotas de *Leishmania* spp foi recolhida em tubos de microcentrifuga de 1,5ml e centrifugada a 500xg por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante livre de parasitos foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 500µl de meio Schneider livre de parasitos (suspensão-mãe). A seguir 50µl da suspensão-mãe foram diluídos em 450µl de meio livre de parasito, feito duas vezes para a obtenção das suspensões 1 e 1'. Este procedimento foi

realizado em cabine de segurança biológica classe II. Para a contagem dos parasitos, 10µl da suspensão 1 foram adicionados a 13µl de formaldeído 36% e 77µl de meio Schneider livre de parasitos. A contagem foi feita em câmara de Neubauer.

3.5 PRIMERS

Foram empregados *primers* dirigidos a quatro genes diferentes, sendo um conjunto para região kDNA minicírculo, dois para o gene localizado no DNA mitocondrial (maxicírculo) e um para gene localizado em DNA nuclear.

Os *primers* para kDNA minicírculo foram descritos por Rodgers et al. (1990). Os *primers* direcionados para o DNA mitocondrial e nuclear foram desenhados neste estudo, a partir de seqüências gênicas de Citocromo B, Citocromo C Oxidase Subunidade II (genes mitocondriais do DNA maxicírculo) e Citocromo C (localizado em DNA nuclear) de *Leishmania* spp obtidas do GenBank.

As seqüências obtidas no GenBank foram alinhadas e *primers* consensuais foram desenhados de forma a amplificar indistintamente fragmentos gênicos de todas as seqüências. Os *primers* estão descritos no quadro 2 abaixo

Nome	Gene	Sequencia (sentido 5' - 3')
13 A	kDNA senso	GTG GGG GAG GGG CGT TCT
13 B	kDNA anti-senso	ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT
CytB - F1	Citocromo B senso	ATG CAT TTR TTT TGT TTA CAT TAT TTT A
CytB - R2	Citocromo B anti-senso	GAA CTT CKA CAA TAH ACA AAT CAT AAT A
CytB - F3	Citocromo B senso	ATG GGT TTT GTG ATA GAT TTG CAT TTT A
CytOxII - F1	Citocromo Oxidase II senso	TGG CTT TTA TWT TAT CAT TTT GAA TG
CytOxII - R2	Citocromo Oxidase II anti-senso	GCA TAA ATC CAT GTA AAA CAC CAC A
CytOxII - F3	Citocromo Oxidase II senso	CTA TTG GAG GGA TGT TTT CAT TAG G
CytOxII - R4	Citocromo Oxidase II anti-senso	CTG TGG CAG TAT TTG ATG AAA ATA AAA C
CytC - F1	Citocromo C senso	ATG CCG CCG AAG GCT CGT G
CytC - R2	Citocromo C anti-senso	CGA CAT CTT CGT GCC AGG CAT AA
CytC - F3	Citocromo C senso	GYG GYG AGA AGC TGT TCA AG
CytC - R4	Citocromo C anti-senso	GTT CTC CAG GTA CAC GTC CAG CA

Quadro 2 – Nome, gene alvo e seqüência de nucleotídeos dos *primers* empregados nesse estudo – São Paulo – 2009

3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR

O protocolo de amplificação foi realizado em um volume final 25µL da mistura dos seguintes componentes: 15,6 µL H₂O mQ, 0,5µL dNTP (10mM), 1,5 µL de cada *primer* (10pmol/ µL), 2,5 µL de 10x PCR Buffer, 0,75 µL MgCl (50mM), 0,15 µL Taq DNA Polimerase Platinum Invitrogen (5U/µL) e 2,5µL de amostra de DNA. A mistura obtida foi levada à máquina termocicladora MyGene™ Series Gradient Thermal Cycler Model MG96G (Long Gene® Scientific instruments Co, Ltd Hangzhou, Zhejiang China).

Os ciclos de amplificação variaram conforme os *primers* utilizados. Para o par de *primers* relatado por Rodgers et al. (1990) o ciclo era composto de um aquecimento inicial de 94°C por 2min, depois 94°C por 30s para desnaturação das fitas, depois a 56°C por 30s para hibridização dos *primers* depois a 72°C por 30s para extensão, repetido 39 vezes. Após as repetições, era mantido a 72°C por 5min e finalmente levado a 15°C. Para os *primers* direcionados a genes de DNA mitocondrial (Citocromo B e Citocromo C Oxidase II) o ciclo era composto de um aquecimento inicial de 94°C por 2min, 94°C por 30s, 52°C por 30s, 72°C por 30s. Repetido 39 vezes, e ao término dos ciclos 72°C por 5min. Para os *primers* direcionados ao DNA nuclear (Citocromo C) o ciclo era composto de 94°C por 2min, 94°C por 30s, 58°C por 30s, 72°C por 30s, repetido 39 vezes, após o último ciclo 72°C por 5min, e após mantido a 15°C.

As PCRs foram realizadas com diferentes combinações de *primers*, conforme citado nos itens que seguem. As dimensões dos produtos amplificados com as diferentes combinações de *primers* pode ser encontrada no quadro 3.

A *heminested* PCR foi realizada somente com *primer* direcionado ao gene codificador de Citocromo B. Neste caso a reação e *heminested* PCR foi realizada exatamente como a primeira, exceto pelo uso dos *primers* CytB F3 com *primer* CytB R2 e de utilizar 2,5µl do produto oriundo da PCR primária como amostra.

Dimensões dos produtos amplificados				
	F1 X R2	F3 X R4	F1 X R4	F3 X R2
Cyt. C Ox II	605bp	365bp	557bp	413bp
Cyt. B	377bp			340bp
Cyt. C	230bp	197bp	243bp	230bp
kDNA	116bp			

Quadro 3 – Dimensões dos produtos amplificados de cada PCR a partir sequências gênicas de *Leishmania chagasi* – São Paulo - 2009

3.7 ELETROFORESE

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em cuba horizontal, imersos em tampão TBE (Tris-Borato 0,045M; EDTA 1mM). A fotodocumentação dos géis com os fragmentos amplificados foi realizado com auxílio da câmera UltraCam 8gD Digital Imaging System (Ultra-Lum, Inc. CA, US)

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento do experimento em tela seguiu uma ordem de eventos, como se pode verificar nos itens que seguem.

3.8.1 Determinação da especificidade analítica das PCRs

Os *primers* descritos no quadro 2 foram empregados em diferentes combinações (para cada gene, como esquematizado no Quadro 3) para amplificar DNA dos isolados de *Leishmania* spp da coleção CLIOC citadas no quadro 1.

O DNA destes isolados foi obtido com o protocolo descrito no item 3.3. Este experimento teve por objetivo verificar quais espécies de *Leishmania* spp. dentre as fornecidas pela CLIOC eram diagnosticadas com sucesso pelos *primers* empregados neste estudo.

3.8.2 Determinação da sensibilidade analítica das PCRs

Para a determinação da sensibilidade analítica das PCRs avaliadas neste experimento, empregou-se apenas um isolado de *L. chagasi*. Os teste foram realizados como segue.

3.8.2.1 Preparo das diluições seriadas de *Leishmania* em meio Schneider

Foram realizadas oito diluições seriadas de formas promastigotas de *L. chagasi* isolado referência CLIOC 579 na base 10 a partir das suspensões 1 e 1' (citadas no item 3.4) usando meio Schneider como diluente, conforme os esquemas dos quadros a seguir. Foram feitas duas réplicas deste experimento (Quadros 4 e 5) gerando duas séries de diluições (de S2 a S9 e de S2' a S9')

Suspensão 2 (S2)	Suspensão 3 (S3)	Suspensão 4 (S4)	Suspensão 5 (S5)	Suspensão 6 (S6)	Suspensão 7 (S7)	Suspensão 8 (S8)	Suspensão 9 (S9)
10µL suspensão 1 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 2 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 3 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 4 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 5 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 6 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 7 + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 8 + 90 µL meio Schneider

Quadro 4 – Preparo das diluições seriadas de *Leishmania chagasi* em meio Schneider – São Paulo - 2009

Suspensão 2' (S2')	Suspensão 3' (S3')	Suspensão 4' (S4')	Suspensão 5'(S5')	Suspensão 6' (S6')	Suspensão 7' (S7')	Suspensão 8' (S8')	Suspensão 9' (S9')
10µL suspensão 1' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 2' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 3' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 4' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 5' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 6' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 7' + 90 µL meio Schneider	10µL suspensão 8' + 90 µL meio Schneider

Quadro 5 – Preparo das diluições seriadas de *Leishmania chagasi* em meio Schneider, réplica 2 – São Paulo - 2009

3.8.2.2 Preparo das suspensões de baço e de aspirado de medula experimentalmente contaminados com as diluições seriadas de *Leishmania chagasi* em meio Schneider

Para este procedimento utilizou-se órgãos de animais sorologicamente negativos e sem sintomas de leishmaniose

Fragmentos de baço foram triturados e homogeneizados em TE, numa relação 20% peso/volume. A seguir foram distribuídos 100µl da suspensão de baço em oito tubos de 1,5ml. Um mililitro de TE foi adicionado em cada tubo, a suspensão resultante foi homogeneizada e centrifugada por 12.000xg por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido três vezes. Finalmente cada tubo foi acrescido de 20µl das suspensões seriadas descritas no quadro 5.

Aspirados de medula óssea foram homogeneizados em TE, numa relação 20% volume/volume. A seguir foram distribuídos 100µl da suspensão de medula em oito tubos de 1,5ml. Um mililitro de TE foi adicionado em cada tubo, a suspensão resultante foi homogeneizada e centrifugada por 12.000xg por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido três vezes. Finalmente cada tubo foi acrescido de 20µl das suspensões seriadas descritas no quadro 5.

Estes processos encontram-se esquematizados nos quadros 6 e 7.

Suspensão Baço 1 (SB1)	Suspensão Baço 2 (SB2)	Suspensão Baço 3 (SB3)	Suspensão Baço 4 (SB4)	Suspensão Baço 5 (SB5)	Suspensão Baço 6 (SB6)	Suspensão Baço 7 (SB7)	Suspensão Baço 8 (SB8)
sedimento baço + 20µL suspensão 2'	sedimento baço + 20µL suspensão 3'	sedimento baço + 20µL suspensão 4'	sedimento baço + 20µL suspensão 5'	sedimento baço + 20µL suspensão 6'	sedimento baço + 20µL suspensão 7'	sedimento baço + 20µL Suspensão 8'	sedimento baço + 20µL Suspensão 9'

Quadro 6 – Suspensões de baço experimentalmente contaminadas com diluições seriadas de *Leishmania chagasi* – São Paulo – 2009

Suspensão Medula 1 (SM1)	Suspensão Medula 2 (SM2)	Suspensão Medula 3 (SM3)	Suspensão Medula 4 (SM4)	Suspensão Medula 5 (SM5)	Suspensão Medula 6 (SM6)	Suspensão Medula 7 (SM7)	Suspensão Medula 8 (SM8)
sedimento medula + 20µL suspensão 2'	sedimento medula + 20µL suspensão 3'	sedimento medula + 20µL suspensão 4'	sedimento medula + 20µL suspensão 5'	sedimento medula + 20µL suspensão 6'	sedimento medula + 20µL suspensão 7'	sedimento medula + 20µL Suspensão 8'	sedimento medula + 20µL Suspensão 9'

Quadro 7 – Suspensões de medula experimentalmente contaminadas com diluições seriadas de *Leishmania chagasi* - São Paulo – 2009

Todas as suspensões descritas nos quadros 4, 5, 6 e 7 tiveram DNA extraído conforme protocolo descrito no item 3.3. Vale ressaltar que 90µl de cada uma das diluições S2 a S9 foram submetidas à extração de DNA (série da réplica 1), enquanto 20µl de cada uma das suspensões S2' a S9' foram submetidas à extração de DNA (série da réplica 2). Para as amostras de baço e medula, todo o conteúdo de cada uma das suspensões foi submetido à extração de DNA. As amostras de DNA obtidas foram então submetidas à PCRs com as combinações dos *primers* que apresentaram melhor resultado nas amostras CLIOC:

- PCR direcionada ao kDNA minicírculo utilizando os *primers* 13A e 13B.
- PCR direcionada ao gene Citocromo C utilizando os *primers* CytC - F3 com CytC - R2 e CytC - F3 com CytC - R4.
- PCR direcionada ao gene Citocromo C Oxidase II utilizando os *primers* CytOxII - F1 com CytOxII - R2 e CytOxII - F3 com CytOxII - R2.

- PCR direcionada ao gene Citocromo B utilizando os *primers* CytB - F1 com CytB - R2 e CytB - F3 com CytB - R2.
- *Heminested-PCR* direcionado ao gene Citocromo B, utilizando os *primers* CytB F1 com CytB R2 na reação primária e CytB F3 com CytB R2 na reação secundária.

3.8.3 Desempenho diagnóstico das PCRs

Com vistas a comparar o desempenho das PCRs em amostras de animais soropositivos para por *Leishmania* spp, as amostras de DNAs de medula e de baço dos animais citados no item 3.2. foram submetidas as seguintes PCRs:

- PCR direcionada ao gene kDNA minicírculo com os *primers* 13A e 13B.
- PCR direcionada ao gene citocromo C utilizando os *primers* CytC - F3 e CytC - R2.
- Heminested-PCR direcionada ao gene Citocromo B utilizando os *primers* CytB - F1, CytB - R2 e CytB - F3.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos gerados pelas PCRs foram identificados através de seqüenciamento automático de ácidos nucleicos com o protocolo descrito a seguir.

3.9.1 Visualização e purificação do produto amplificado

Os fragmentos amplificados pela heminested-PCR do gene codificador de Citocromo B, e pela PCR dos genes codificador Citocromo C e kDNA minicírculo foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.7. Após a corrida eletroforética, executada a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel), o gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL durante 20 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados o gel foi observado em transluminador ultravioleta.

Logo após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese, as bandas de interesse foram recortadas do gel e então purificadas com o auxílio de kit comercial, seguindo instruções do fabricante (GFX *Gel extraction system*).

3.9.2 Reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o *kit* comercial *BigDye™ terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems*. O DNA obtido de cada produto de PCR após a reação de purificação descrita no item anterior foi utilizado como amostra para a reação de seqüenciamento. Cada produto de PCR foi seqüenciado em duplicata, com os *primers* senso e anti-senso para cada reação.

A reação de seqüenciamento foi executada utilizando-se para cada amostra 4 µL *Sequencing buffer*, 2 µL de *BigDye™* e 1 µL *primer*. A quantidade de DNA colocada foi de 13 µL, totalizando um volume final de 20 µL.

O ciclo de seqüenciamento foi efetuado no termociclador *Mastercycler Gradient Eppendorf* com a utilização do seguinte programa:

Desnaturação inicial: 96°C por 1 minuto

Desnaturação: 96°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Hibridização: 50°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Extensão: 60°C por 4 minutos

Rampa: 1,0°C/s

O ciclo foi repetido por 39 vezes a partir da etapa de desnaturação (segunda etapa).

3.9.3 Precipitação do DNA amplificado

Após a reação de seqüenciamento os produtos foram purificados por precipitação em álcool. Em cada amostra foi adicionado 80 µL de isopropanol a 65%, que após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegida da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 16.000 rpm por 30 minutos. O isopropanol foi descartado por inversão de tubo e o sedimento foi homogeneizado com 300 µL de etanol a 60%. Uma nova centrifugação foi precedida a 16.000 rpm por 15 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente aspirado com o auxílio de pipeta e os microtubos foram conduzidos ao banho-seco a 90°C por 5 minutos.

As amostras precipitadas foram mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento.

3.9.4 Eletroforese de seqüenciamento

As amostras precipitadas foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (*Applied Biosystems*) na proporção de 5:1, colocadas em banho seco a 95°C por 3 minutos e depois refrigeradas a 4°C por 2 minutos. Em seguida foram aplicadas na placa de seqüenciamento através do protocolo do manual técnico do equipamento ABI PrismTM 377 DNA Sequencers (*Applied Biosystems*).

3.9.5 Análise das seqüências

A qualidade dos produtos seqüenciados, bem como a montagem da seqüência final de cada amostra foi realizada utilizando-se o programa *Phred-Phrap*, contido na suíte *Codoncode Aligner*.

Determinadas as seqüências de nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no GenBank.

Com o auxílio do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) foi avaliado o grau de diversidade nucleotídica existente entre as seqüências e árvores filogenéticas foram elaboradas empregando-se métodos de distância.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA DAS PCRs

No quadro 8 encontram-se os resultados das PCRs empregando diferentes combinações de *primers* direcionados aos genes codificadores de Citocromo C Oxidase II, Citocromo B e Citocromo C para amplificar seqüências gênicas dos isolados citadas no quadro 1. Estas amostras foram também testadas com os *primers* 13A e 13B (direcionados ao kDNA minicírculo) resultando todas positivas.

Observou-se que os *primers* direcionados ao gene codificador Citocromo B tiveram bom desempenho com todas as espécies de *Leishmania* da coleção CLIOC, enquanto os outros *primers* direcionados para o Citocromo C Oxidase II e Citocromo C falharam na detecção das amostras em algumas combinações.

		F1 X R2	F3 X R4	F1 X R4	F3 X R2
C y t . O x I I	1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	6	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	11	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	12	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	13	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	14	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	15	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	16	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
C y t . B	1	POSITIVO			POSITIVO
	2	POSITIVO			POSITIVO
	3	POSITIVO			POSITIVO
	4	POSITIVO			POSITIVO
	5	POSITIVO			POSITIVO
	6	POSITIVO			POSITIVO
	7	POSITIVO			POSITIVO
	8	POSITIVO			POSITIVO
	9	POSITIVO			POSITIVO
	10	POSITIVO			POSITIVO
	11	POSITIVO			POSITIVO
	12	POSITIVO			POSITIVO
	13	POSITIVO			POSITIVO
	14	POSITIVO			POSITIVO
	15	POSITIVO			POSITIVO
	16	POSITIVO			POSITIVO
C y t . C	1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	5	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	10	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	11	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	12	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	13	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	14	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	15	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	16	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Quadro 8 – Especificidade analítica das PCRs com as diferentes combinações de *primers* na detecção de isolados CLIOC. F1 x R2: *Primer* senso externo com *primer* anti-senso externo, F3 x R4: *Primer* senso interno com *primer* anti-senso interno, F1 x R4: *Primer* senso externo com *primer* anti-senso interno, F3 x R2: *Primer* senso interno com *primer* anti-senso externo – São Paulo – 2010

Na figura 1 encontram-se resolvidos em gel de agarose 2% os produtos amplificados com cada par de *primers* direcionado aos genes codificador de Citocromo B, Citocromo C Oxidase II e Citocromo C em amostras de DNA extraídas de isolados de *L. chagasi*.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados pelos *primers* direcionados aos genes codificadores de citocromo. **1** – Ladder, **2** – 605 bp (*primer* CytOxII F1 com *primer* CytOxII R2), **3** – 365bp (*primer* CytOxII F3 com *primer* CytOx II R4), **4** – 557 bp (*primer* CytOx II F1 com *primer* CytOxII R4), **5** – 413bp (*primer* CytOxII F3 com *primer* CytOxII R2), **6** – vazio, **7** – 276bp (*primer* CytC F1 com *Primer* CytC R2), **8** – 197bp (*primer* CytC F3 com *primer* CytC R4), **9** – 243bp (*primer* CytC F1 com *primer* CytC R4), **10** – 230bp (*primer* CytC F3 com *primer* CytC R2), **11**- vazio, **12** – 377bp (CytB *primer* F1 com *primer* R2), **13** – 340bp (*primer* CytB F3 com *primer* R2) – São Paulo – 2010

4.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS PCRs

Foram realizados PCRs com os DNAs extraídos a partir das diluições seriadas de *L. chagasi* em meio Schneider, em suspensão de baço e suspensão de medula utilizando as combinações dos *primers* que obtiveram maior positividade nas amostras CLIOC, identificadas no quadro 8. Os resultados obtidos estão esquematizados nos quadros 9, 10, 11 e 12.

	Quantidade de parasitos em 2,5µl	Diluição seriada Leishmania chagasi nº CLIOC 579 - PCR							
		Rodgers	Cytochromo B		Cytochromo Oxidase II		Cytochromo C		Cytochromo B
		13A x 13B	F1xR2	F3xR2	F1xR2	F3xR2	F3xR4	F3xR2	Heminested (F1xR2 + F3xR2)
S9	0,0045 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S8	0,045 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S7	0,45 parasitos	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S6	4,5 parasitos	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
S5	45 parasito	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
S4	450 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
S3	4.500 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
S2	45.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Quadro 9 – Resultado das PCRs nas diluições seriadas (réplica 1) com as melhores combinações de *primers* de Citocromo B (PCR e *Heminested*-PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C. A suspensão S2 foi determinada contendo 1.000 parasitos para cada 0,1µl pela contagem feita na câmara de Neubauer, ou seja, 10.000 parasitos por µl. Para a extração destas diluições seriadas foram utilizados 90µl da suspensão S2 equivalente a 900.000 parasitos, resultando no volume final de 50µl de DNA extraído. Para a PCR foram utilizados 2,5µl destes 50µl de DNA, volume que contém, teoricamente, o DNA de 45.000 parasitos – São Paulo – 2010

	Quantidade de parasitos em 2,5µl	Diluição seriada Leish. Chagasi nº 579 - Limiar de detecção - Réplica 2 - PCR							
		Rodgers	Cytochromo B		Cytochromo Oxidase II		Cytochromo C		Cytochromo B
			1 x2	3x2	1x2	3x2	3x4	3x2	Heminested
S9'	0,001 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S8'	0,01 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S7'	0,1 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S6'	1 parasito	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
S5'	10 parasito	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
S4'	100 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
S3'	1.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
S2'	10.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Quadro 10 – Resultado das PCRs nas diluições seriadas (réplica 2) com as melhores combinações de *primers* de Citocromo B (PCR e *Heminested*-PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C. A suspensão S2' foi determinada contendo 1.000 parasitos para cada 0,1µl pela contagem feita na câmara de Neubauer, ou seja, 10.000 parasitos por µl. Para a extração destas diluições seriadas foram utilizados 20µl da suspensão S2' equivalente a 200.000 parasitos, resultando no volume final de 50µl de DNA extraído. Para a PCR foram utilizados 2,5µl destes 50µl de DNA, volume que contém, teoricamente, o DNA de 10.000 parasitos – São Paulo – 2010

	Quantidade de parasitos em 2,5µl	Diluição seriada Leishmania chagasi nº CLIOC 579 com suspensão de baço - PCR							
		Rodgers	Cytochromo B		Cytochromo Oxidase II		Cytochromo C		Cytochromo B
		13A x 13B	F1xR2	F3xR2	F1xR2	F3xR2	F3xR4	F3xR2	Heminested (F1xR2 + F3xR2)
SB9	0,001 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SB8	0,01 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SB7	0,1 parasitos	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
SB6	1 parasito	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
SB5	10 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
SB4	100 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
SB3	1.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
SB2	10.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Quadro 11 – Resultado das PCRs nas diluições seriadas com suspensão de baço com as melhores combinações de *primers* de Citocromo B (PCR e *Heminested*-PCR), Citocromo C Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010

Para a determinação das sensibilidades analíticas em suspensões de baço foram utilizados, na contaminação experimental, 20µl das Suspensões S2' a S9'. Como a suspensão S2' foi determinada contendo 10.000 parasitos por microlitro, e a suspensão SB1 foi misturada a 20 µl da suspensão S2', então deduz-se que 200.000 parasitos estariam contidos na suspensão SB1. Assim, usando raciocínio análogo ao empregado na página anterior, considerou-se que os 2,5µl dos 50µl do volume final de DNA extraído utilizados na PCR continham, teoricamente, o DNA de 10.000 parasitos (Quadro 11). As mesmas considerações acima valem para os resultados obtidos com amostras de medula óssea experimentalmente contaminadas (Quadro 12).

	Quantidade de parasitos em 2,5µl	Diluição seriada Leishmania chagasi nº CLIOC 579 com suspensão de medula - PCR							
		Rodgers	Cytochromo B		Cytochromo Oxidase II		Cytochromo C		Cytochromo B
		13A x 13B	F1xR2	F3xR2	F1xR2	F3xR2	F3xR4	F3xR2	Heminested (F1xR2 + F3xR2)
SM9	0,001 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SM8	0,01 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SM7	0,1 parasitos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SM6	1 parasito	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SM5	10 parasitos	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
SM4	100 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
SM3	1.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
SM2	10.000 parasitos	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Quadro 12 – Resultado das PCRs nas diluições seriadas com suspensão de medula com as melhores combinações de *primers* de Citocromo B (PCR e *Heminested*-PCR), Citocromo Oxidase II, Citocromo C – São Paulo – 2010

4.3 DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DAS PCRs

No quadro 13, encontram-se os resultados das PCRs com os *primers* mencionados no item 2.9 em amostras de medula e de baço de cães naturalmente infectados.

Dentre as amostras dos animais naturalmente infectados, foi possível detectar DNA de *Leishmania* spp em todas as combinações testadas em apenas dois animais (17 e 75). A positividade da PCR empregando os *primers* direcionados aos genes de Citocromo C e Citocromo B, PCR de CytC e Heminested-PCR de CytB foram nitidamente inferiores a positividade da PCR dos *primers* direcionados ao kDNA minicírculo.

Animal	kDNA		Cyt C - PCR		CytB - Heminested	
	Baço	Medula	Baço	Medula	Baço	Medula
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10	Positivo					
11	Positivo					
12						
13						
14						
15		Positivo				
16						
17	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
18		Positivo				
19						
20						
21						
22						
23						
24		Positivo				
25						
26		Positivo				
27		Positivo				
28		Positivo				
29		Positivo				
30		Positivo				
31						
32						
33						
34		Positivo				
35						
36						
37						
38						
39		Positivo				
40						
41		Positivo				
42		Positivo				
43	Positivo					
44	Positivo	Positivo			Positivo	
45	Positivo	Positivo				
46						
47	Positivo					
48	Positivo	Positivo				
49						
50	Positivo	Positivo				
51		Positivo				
52						
53	Positivo					
54		Positivo				
55						
56						
57		Positivo				
58						
59						
60						
61		Positivo				
62		Positivo				
63		Positivo				
64						
65						
66						
67						
68						
69						
70						
71						
72						
73						
74						
75	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Quadro 13 – Resultado das PCRs direcionadas ao kDNA minicírculo e Citocromo C e *Heminested*-PCR direcionada ao gene do Citocromo B para detecção de *Leishmania* spp nos animais naturalmente infectados. Em verde escuro encontram-se os resultados positivos, em verde claro encontram-se os resultados considerados positivos, porém estes possuem uma pequena diferença em relação a dimensão do fragmento amplificado esperado (Figura 2). Em cinza encontram-se os resultados negativos – São Paulo – 2010

Os produtos amplificados a partir de algumas amostras positivas pela PCR direcionada ao kDNA minicírculo em amostras de medula de cães naturalmente infectados estão identificadas na figura 2.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados pelos *primers* direcionados kDNA minicírculo. Amostras de medula positivas **1** – Ladder, **2** – 15, **3** – 17, **4** – 18, **5** – 24, **6** – 26, **7** – 27, **8** – 28, **9** – 29, **10** – Controle Positivo, **11** – 30, **12** – 32, **13** – 34, **14** – 39, **15** – 41, **16** – 42, **17** – 44, **18** – 45, **19** – 48, **20** – Ladder – São Paulo – 2010

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PRODUTOS DE PCRs

Os produtos gerados pelos *primers* 13A e 13B a partir de amostras de medula dos animais de número 17, 24, 28, 29, 30, 57, 62 e 75 foram seqüenciados, mas apenas trechos parciais foram obtidos. As demais amostras produziram seqüências de baixa qualidade que impossibilitaram completamente a análise. Por ter sido impossível usar os dados moleculares para reconstruções filogenéticas os trechos aproveitáveis foram submetidos ao sítio de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), para pesquisa de seqüências similares disponíveis no GenBank.

As seqüências das amostras 17, 57, 62 e 75 foram similares entre si e com similaridade > 95% com *L. infantum*. As seqüências das amostras 24, 28, 29 e 30, foram 100% similares entre si, mas sem similaridade com nenhuma seqüência disponível no GenBank. Os segmentos analisados mostrando as similaridades entre as seqüências podem ser verificados nas figuras 3 e 4.

Ao contrário, as seqüências obtidas com os *primers* direcionados aos genes codificadores de Citocromo B e Citocromo C foram determinadas com sucesso. As seqüências oriundas das amostras 17 e 75 foram idênticas entre si e com a seqüência de *L. infantum* EF579913, enquanto aquela oriunda da amostra 44 (apenas de Citocromo B) não revelou similaridade elevada com nenhuma seqüência conhecida (Figura 5). Depois de submetida à busca BLAST, a seqüência da amostra 44 foi alinhada com as seqüências mais similares que foram recuperadas do GenBank e analisada com a reconstrução apresentada na figura 5. As seqüências de Citocromo C das amostras 17 e 75 foram idênticas entre si e idênticas a seqüência de *L. infantum* (XM_001464583).

Figura 3 – Alinhamento de seqüências geradas pelos *primers* 13A e 13B a partir da amostra 30, mostrando a similaridade da mesma com fragmentos homólogos oriundos de isolados de diversas espécies de *Leishmania* – São Paulo – 2010

Figura 5 – Reconstrução filogenética de seqüências codificadoras de Citocromo B de *Leishmania* spp. e outros Trypanossomídeos. Árvore não enraizada inferida por método de distância neighbor-joining com teste bootstrap de 1000 réplicas, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros – São Paulo – 2010

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, objetivou-se avaliar o desempenho analítico e diagnóstico de PCRs baseadas em *primers* direcionados à alvos particulares do genoma de *Leishmania* spp. Foram testados *primers* direcionados a lócus gênicos de genoma mitocondrial e nuclear que tivessem aplicabilidade para estudos filogenéticos com vistas ao desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação do parasito. Para tanto, três parâmetros foram determinados para orientar a escolha dos alvos: (i) os *loci* alvos deveriam atender à premissa de maior importância para estudos filogenéticos que é a premissa de homologia; (ii) visou-se a pesquisa de genes que pudessem estar presentes em múltiplas cópias no genoma do parasito, de forma a maximizar a sensibilidade do ensaio empregado; e (iii) buscou-se marcadores que pudessem, em futuros estudos de filogenia molecular produzir alinhamentos com pouca ou nenhuma ambigüidade, como é o caso de seqüências codificadoras de proteínas.

Por tais razões, foram desenvolvidas sondas moleculares direcionadas ao DNA mitocondrial, em particular aos *loci* codificantes de Citocromo B e Citocromo C Oxidase II. O gene codificador de proteínas da família dos citocromos tem se mostrado um marcador de grande valor para as filogenias moleculares, pois tem permitido a reconstrução de histórias evolutivas nas mais diversas classes de organismos. (MARTINEZ et al., 2006). Esta classe de gene não é comumente afetada por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas neste lócus são sinônimas (MEYER, 1994). Além disso, pelo fato de serem genes codificadores de proteínas universais (moléculas relacionadas à acepção de elétrons na cadeia respiratória), permite que alinhamentos com seqüências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos entre seqüências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou seqüências não codificadoras (RUSSO, 2001).

A escolha do gene Citocromo C se deveu ao fato de o mesmo ser também um gene codificador de proteína universal e ter a mesma aplicabilidade, em termos de estudos filogenéticos, dos genes de citocromo localizados na mitocôndria. Vale

ressaltar que o gene codificador de Citocromo C é um gene que codifica um produto mitocondrial, mas é localizado no genoma nuclear do parasito.

O desenho, dos *primers* desenvolvidos neste estudo foi baseado em alinhamentos de seqüências gênicas disponíveis no GenBank, em pesquisas realizadas durante o ano de 2008/2009. Os *primers* foram desenhados para hibridizarem com todas as seqüências disponíveis até aquele momento e para tanto, sítios degenerados foram inseridos na seqüência dos oligonucleotídeos, quando necessário.

A análise da especificidade analítica permitiu verificar que os *primers* baseados em Citocromo B são capazes de amplificar seqüências gênicas de todas as amostras CLIOC. Da mesma forma, os *primers* direcionados ao Citocromo C (F3 x R4 e F3 x R2) também amplificaram ácidos nucléicos de todos os isolados CLIOC. Em relação aos marcadores direcionados ao Citocromo C Oxidase II, apenas um par de *primer* teve desempenho diagnóstico satisfatório em todos os isolados. Estes resultados orientaram a escolha dos *primers* que participariam dos experimentos de desempenho diagnóstico da PCR em amostras de cães soropositivos. Por outro lado, embora os *primers* direcionados a seqüências de Citocromo C Oxidase II não tenham sido eficientes na amplificação de seqüências de parte expressiva das amostras CLIOC eles se mostraram eficazes na amplificação de parasitos associados à leishmaniose visceral.

Em relação aos experimentos de sensibilidade analítica foi notável a superioridade dos *primers* desenhados por Rodgers et al. (1990) em relação aos demais. O locus, contra o qual os *primers* 13A e 13B são direcionados, ocorrem em kDNA minicirculo que está presente em milhares de cópias no genoma celular do parasito, contra dezenas de cópias do DNA maxicirculo que hospeda os genes para Citocromo B e Citocromo C Oxidase II. Esta superioridade em termos de números de cópias certamente explica a maior sensibilidade analítica da PCR baseada em *primers* de kDNA minicirculo.

Os valores anotados nos quadros 9, 10, 11 e 12 que mostram a comparação do desempenho analítico dos diversos *primers* dizem respeito ao número absoluto de parasitos detectado em cada PCR nos diferentes substratos biológicos. Este número é baseado em uma estimativa teórica da quantidade de parasitos que devem estar sendo transferidos em cada PCR. Então, admitindo-se que uma

determinada amostra contenha 1000 parasitos em um volume total de 100µL de solução e ao submetemos esta amostra ao processo de extração de DNA, todo o DNA daqueles 1000 parasitos seria recuperado em 50µL de TE (como no protocolo descrito no apêndice A). Se 2,5µL de DNA extraído é utilizado em uma PCR, admite-se, teoricamente, que este volume contenha o DNA de 50 parasitos (considerando a hipótese pouco provável que o procedimento de extração de DNA tenha eficiência de 100%). Pelo fato de que os genes-alvos amplificados pelas PCRs descritas neste experimento estarem presentes em mais de uma cópia por célula parasitária, explica-se o fato de, em alguns casos, as técnicas terem detectado a quantidade teórica (e biologicamente sem sentido) de menos de um parasito.

Ainda em relação aos experimentos para aferição de sensibilidade analítica, nota-se que a adição de material biológico de origem canina em amostras de DNA de *Leishmania* não interferiu negativamente no desempenho analítico das PCRs. Pelo contrário, as PCRs realizadas em amostras contendo DNA de cão (oriundas de células de medula e baço) pareceram com ligeiro incremento de sensibilidade. A explicação para este evento pode estar no fato de que as amostras estiveram com adequado grau de purificação, conforme dados obtidos com espectrofotometria, de forma que os substratos oriundo de baço e medula óssea estavam livres de inibidores de polimerização. A determinação da qualidade do DNA obtida com o procedimento de extração revelou relação entre leituras A260/A280 sempre acima de 1,8 (dados não mostrados). Ainda, a presença de DNA exógeno nas amostras pode até ter interferido positivamente no desempenho das PCRs em virtude do aumento da massa total de DNA a ser precipitada durante o procedimento de extração de DNA, o que, por conseguinte, acabou por aumentar a recuperação de material extraído. Esta condição é resultante do provável efeito carreador do DNA exógeno (em maior quantidade) sobre o DNA do analito.

Todas as PCRs empregadas neste estudo foram realizadas sob condições idênticas em termos de concentração de reagentes. Por esta razão, é possível que alterações no protocolo de amplificação possam alterar seus desempenhos. Esta questão carece de mais investigação.

Em relação às temperaturas de hibridização adotadas em cada um dos ciclos, optou-se por valores distintos para cada par de *primers*, de acordo com suas respectivas temperaturas de “melting”. Assim, os *primers* com maior conteúdo de

bases A/T (menor temperatura de “melting”) foram empregados em ensaios com temperatura de hibridização menores, enquanto aqueles com menor conteúdo de bases A/T foram empregados com temperaturas de hibridização maiores. De fato, durante a execução dos testes preliminares, verificou-se que os *primers* direcionados ao Citocromo B e Citocromo C Oxidase II tiveram melhor desempenho a temperatura de 52°C do que com temperatura superiores (dados não mostrados).

Considerando o desempenho diagnóstico dos *primers* empregado neste estudo, verifica-se que os *primers* direcionados ao kDNA minicírculo apresentaram-se muito mais sensíveis. Pela análise dos resultados verifica-se que apenas dois cães foram classificados como positivos pelos *primers* direcionados a genes codificadores de citocromo. É improvável que esta diferença de desempenho seja decorrente de alta especificidade dos *primers* direcionados aos genes de citocromos, pois pelos resultados do experimento de especificidade analítica, todos os *primers* foram capazes de detectar todos os isolados-padrão.

Entretanto, vale ressaltar que os produtos amplificados com os *primers* 13A e 13B em uma quantidade expressiva de amostras apresentaram-se com dimensões ligeiramente inferiores aqueles produzidos a partir de amostras-padrão de *L. chagasi*. Polimorfismos são eventos bastante freqüentes neste alvo quando se compara seqüências gênicas oriundas de diversas espécies de *Leishmania* e mesmo quando se compara seqüências gênicas de organismos da mesma espécie (veja alinhamentos nas Figuras 3 e 4). Ainda assim, pelo que se observa é possível que as amostras classificadas como positivas pelas provas direcionadas ao gene kDNA minicírculo sejam na verdade resultado da amplificação de seqüências gênicas homólogas de organismos relacionadas, mas distintos do gênero *Leishmania*. Investigações para se conhecer a identidade dos produtos amplificados são ainda necessários e devem ser conduzidos em estudos futuros.

Neste trabalho não foi possível determinar com confiabilidade a seqüência completa de nucleotídeos dos fragmentos de PCR gerados com os *primers* direcionados ao kDNA minicírculo. Porém, em parte das amostras, pequenos fragmentos foram obtidos e submetidos à busca de similaridade no sítio BLAST gerando resultados que mostram similaridade das seqüências com seqüências de *Leishmania infantum*. Estes resultados fornecem indícios de que os fragmentos amplificados com os *primers* 13A e 13B são de fato originados de organismos

relacionados à *Leishmania* spp. Porém, em algumas das amostras, em especial naquelas que foram produzidos fragmentos ligeiramente menores que aqueles de *L. infantum*, foram geradas seqüências de nucleotídeos sem qualquer similaridade com segmentos homólogos de *Leishmania* spp o que pode indicar que tais seqüências sejam oriundas de outro agente relacionado (ou não) ao gênero *Leishmania* spp.

Por outro lado, a análise filogenética realizada com seqüências obtidas com os *primers* direcionados a genes Citocromo B e Citocromo C nas amostras 17 e 75 revelaram que as mesmas podem ser identificadas inequivocamente como *L. chagasi*. No caso da amostra 44, seqüências gênicas foram amplificadas apenas com *primers* direcionados ao gene codificador de Citocromo B e apenas na amostra de baço. A análise filogenética realizada com esta seqüência revela maior relação com seqüências de *Leishmania* spp. É possível que o animal da amostra 44 estivesse hospedando outro organismo do grupo dos Trypanossomatídeos, ainda desconhecido. Entretanto, experimentos com mais marcadores devem ser conduzidos para que esta hipótese seja confirmada.

Os resultados dos experimentos de limiar de detecção para os *primers* 13A e 13B diferiram grandemente dos resultados obtidos por outros autores em investigações semelhantes. Nunes et al. (2007) registraram sensibilidade para detecção de 0,1 parasito em 500µl de sangue experimentalmente contaminado. Nos resultados deste estudo, foi possível detectar um mínimo de cinquenta parasitos por 500µL de suspensão de *Leishmanias* (Quadro 9). Por outro lado, esta expressiva diferença em termos analíticos não se refletiu em diferença de igual magnitude no desempenho diagnóstico dos *primers* 13A e 13B. Nunes et al. (2007) encontraram 55 amostras positivas em um total de 80 amostras de sangue de cão soropositivos pela RIFI, enquanto os resultados deste experimento registraram 24 amostras positivas de aspirado de medula óssea em 72 amostras de cães soropositivos pela mesma técnica. Vale salientar que todos os animais amostrados no presente experimento, embora sorologicamente positivos eram assintomáticos. As diferenças de sensibilidades analíticas nos dois trabalhos podem ter ocorrido devido a forma de contagem ou de diluição diferentes de um estudo para o outro, além de discrepâncias na eficiência dos procedimentos de extração, purificação e concentração de ácidos nucléicos.

Outra condição digna de nota diz respeito à aparente falta de especificidade da técnica sorológica, pois uma parte expressiva das seqüências obtidas de cães soropositivos não foi identificada como seqüências de *Leishmania* spp. Porém, esta asserção carece de mais investigação, até que os fragmentos de produtos de PCR gerados com os *primers* descritos por Rodgers et al. (1990) sejam adequadamente seqüenciados.

Os resultados da detecção por PCR em tecidos de baço e medula óssea revelou que ambos foram concordantes em apenas seis das 29 amostras classificadas como positivas, indicando que a associação das duas amostras pode ser um recurso proveitoso para aumentar o desempenho diagnóstico da técnica molecular em avaliações *post-mortem*. Ainda, os resultados em aspirados de medula óssea indicam que a pesquisa de *Leishmania* por PCR neste tipo de amostra pode se constituir uma alternativa para confirmação diagnóstica *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

- A PCR direcionada ao kDNA minicírculo apresentou uma sensibilidade analítica muito superior as PCRs direcionadas ao DNA maxicírculo e nuclear.
- Pelo menos uma combinação dos *primers* de cada marcador foi capaz de detectar DNA de todas as espécies da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), o que os credencia uma ferramenta útil para identificação de espécies de *Leishmania spp.*
- A PCR direcionada ao kDNA minicírculo apresentou uma sensibilidade diagnóstica muito superior as PCRs direcionadas ao DNA maxicírculo e nuclear.
- Amostras de baço e medula óssea produzem informações complementares no diagnóstico molecular *post-mortem* de *Leishmania spp.* em cães soropositivos.
- As amostras de aspirado de medula óssea podem ser usadas no diagnóstico molecular *in vivo* do agente em cães soropositivos assintomáticos.

REFERÊNCIAS

ALVES, W., A.; BEVILACQUA, P., D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: na epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.

ANDRADE DE, H. M.; REIS, A. B.; DOS SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.3-4, p. 231-238, 2006.

ASHFORD, R. W.; BATES, P. A. Leishmaniasis in the Old World. In. COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. New York, USA: Wiley Blackwell, 1998. v. 5, p. 215-240.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmanioses – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p.324-330, 2008.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H. P.; CONRADO-DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspiration as sampling methods for the parasitological detection of *leishmania chagasi* infections in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 135-141, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; SANTOS, S. O.; CHAGAS-JUNIOR, A. D.; PAIXÃO, M.; AGUIAR, P. H. P.; DOS-SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 251-261, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância sanitária em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância sanitária em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M. ; GALLEGU, M. ; GAMBARELLI, F. ; PORTUS, M. Practical approach for typing strains of *leishmania infantum* by microsatellites analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3391-3397, 2002.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: Aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, ano 12, n. 71, p. 86-92, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de. **Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil**. 2004. 225 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, (BEPA) v. 4, n. 39, p. 27-39, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L.; GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de flebotomíneos com registros de casos da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 299-306, 2002.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of *leishmania* skin test in the detection of canine *leishmania*-specific cellular immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 3, p. 213-220, 1998.

CASTRO, A. G. Controle, diagnóstico e tratamento de leishmaniose visceral. (Calazar) – Normas Técnicas. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 1996, 86 p.

CONDINO, M. L. F.; SAMPAIO, S. M. P.; HENRIQUES, L. F.; GALATI, E. A. B.; WANDERLEY, D. M. V.; CORRÊA, F. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 4, p. 355-360, 1998.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M. D.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Ascari: Ixodidae) in the epidemiology of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992, p. 718-719.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMANDA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. **Transactions of the royal Socociety of Tropical Medicine Hygiene**. v. 98, p. 12-17, 2004.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO, J. M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**. v. 55, p. 277-283, 2006.

DA SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; BRASIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 251-257, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPEBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *leishmania*- a mini review. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; MARCO, A.; PUMAROLA, M. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **Veterinary Record**, v. 126, p. 90, 1990.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS. An update. Proceedings of the international canine leishmaniasis forum. 1999, Barcelona, Spain. R. Killick Kendrick Ed. Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 6-10.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2 ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 255-262.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S.; Importance of *Lutzomia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 213-220, 2005.

FREITAS, E.; MEOL, M.N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *leishmania infantum* via blood tranfusion in dogs: Potential for infeccion and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, 2006, p. 159-167.

GERALDO JR, C. A.; DUARTE, R.; MARTIN, P. R.; DORETTO, J. S.; LOBO E SILVA, M. A.; USHIKOSHI, W. S. Leishmaniose visceral canina. Primo descrição em Espírito Santo do Pinhal – SP. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 6, 2006, São Paulo. **Anais CONPAVEPA**, p. 200, São Paulo: ANCLIVEPA, 2006.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 31, p. 26-36, 2006.

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

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006 p. 685-698.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S. ; BOELART, M. ; CROFT, S. L.; DESJEUX, P. WASUNNA, M. K. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed reseach and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 494-501, 2002.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELL, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 7, p.1989-1995, 1998.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A. STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: Comparative application of tradicional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

JOSE, F. F.; SILVA, I. M.; ARAUJO, M. I.; ALMEIDA R. P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537-542, 2001.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; MILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical Trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98 p. 247-261, 2001.

- KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1224-1234, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. American visceral leishmaniasis, on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v.81, p. 517, 1987.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Org.). **Topley & Wilson microbiology and microbial infections**. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2005. chap. 17, v. 2, p. 313-349.
- LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; PAES, A. C. American visceral leishmaniasis: A case report. **Journal Venomous Animal and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 361-372, 2005.
- LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E. C.; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Prasitology**, v. 21, n. 8, p.363-369, 2005.
- MAHBOUDI, F.; ABOLHASSANNI, M.; TEHRANI, S. R.; AZIMI, M. Differentiation of old and new world *leishmania* species at complex and species levels by PCR. **Scand Journal Infectious Diseases**, v. 34, p. 756-458, 2002.
- MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 1-9, 1996.
- MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001, p. 13-30.
- MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H. P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 7, p. 3147-3153, 2003.

MARTINEZ, F. H.; VILLALOBOS, G. C.; CEVALLOS, A. M.; DE LA TORRE, P.; LACLETTE, J. P.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ESPINOZA, B. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, n. 2, p. 279-287, 2006.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, v. 128, p. 263-267, 2004.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome B gene as a molecular marker. **Trends Ecology Evolution**, v. 9, p. 278-280, 1994.

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 388.

MILLES, M. A.; VEXENAT, J. A.; CAMPO, J. H. F.; CASTRO, J. A. F. Canine Leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral Leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: an update. **Proceedings of international Canine Leishmaniasis Fórum**. 1999, Barcelona, Spain. R. Killick-Kendrick, Wiesbaden: Hoeschst Roussel Veterinary p. 46-53, 1999.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 178-183, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1265-1266.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu. 2003. p. 31-72.

NIETO, C. G.; GARCIA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRON, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

NOYES, H. A.; REYBURN, H.; BAILEY, J. W.; SMITH, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 10, p. 2877-2881, 1998.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDINI, F. P.; DE PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2008. chap 2.1.8, p. 240-250. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf>. acesso em: maio 2010.

PENNACCHI, M.; RENDA, P. Leishmaniose: Cada vez mais na cidade. **Cães e Cia**, v. 22, n. 248, p. 42- 2000.

PENNISI, M. G.; REALE, S.; LO GIUDICE, S.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S. VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for Leishmaniasis with Allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 301-303, 2005.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 68, p. 4-13, 2009.

RAMOS, G. P.; FILHO, F. B. R.; BOTELHO, G. G.; VOGEL, J. Valores bioquímico-séricos de cães portadores de leishmaniose visceral. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, n. 5, p. 192-195, 1994.

RAVEL, S.; CUNY, G.; REYNES, J.; VEAS, F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**. v. 59, n. 3, p. 187-196, 1995.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 37, p. 2931-2935, 1999.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. 2001. p. 214-266.

RIBEIRO, V. Leishmaniose: sorologia vs imunização . Posso tratar cães? In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 5., 2005, São Paulo. **Anais CONPAVEPA**, São Paulo: ANCLIVEPA, 2005.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

ROSA, I. C. O. S.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: uma breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-27, 1997.

RUSSO, C.A.; Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. 1 ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 130-136, 2001.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. São Paulo: SES, 2006. 160p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, p. 16-23, set. 2007.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**. v. 123 p. 311-330. 2006.

SCHOONE, G. J.; HAILU, A.; KROON, C. C.; NIEUENHUYIS, J. L.; SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAM, L. A fast agglutination screening test (FAST) for detection of anti-leishmania antibodies. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. v. 95, p. 400-401, 2001.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Disease of dog and cat**. Philadelphia : 1998, W.B. Saunders Company, p. 450-458.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. M.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TINTAYA, K. W.; YING, X.; DEDET, J. P.; RIJAL, S.; DE BOLLE, X.; DUJARDIN, J. C. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloproteinase glycoprotein 63 in the *leishmania donovani* complex . **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1035-1043, 2004.

ULIANA, S. R. B.; NELSON, K.; BERVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

VAN EYS, G. J.; SCHOONE, G. J.; KROON, N.; EBELING, S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 1992.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LE RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 13, p. 328-330, 1997.

VICKERMAN, K.; TETLEY, T. Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their role in attachment. In: BLOODGOOD, R. A. **Ciliary and Flagellar Membranes**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1990. p. 267-304.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**. v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

APÊNDICE A

Protocolo 1 – Extração dos tecidos dos animais:

1. As amostras de tecidos dos animais foram maceradas e diluídas a 20% em solução de TE (TrisHCl 10mM pH8,0; EDTA 1mM pH8,0);
2. 100 µL da suspensão foram centrifugadas por 12.000 x g por 10 minutos e desprezado o sobrenadante vertendo o tubo cuidadosamente;
3. Foi adicionado ao sedimento 1,0mL de TE, sendo agitado brevemente em vórtex e repetido o passo n° 2;
4. O sedimento foi resuspendido em 500µL de tampão TNE-SDS (concentração final de TNE-SDS em cada tubo: 10mM TrisHCl pH8,0; 25mM EDTA pH8,0, 100mM NaCl; 1%SDS)*;
5. Foi adicionado em cada tubo 10µL de proteinase K (a 20mg/mL);
6. A mistura foi incubada em banho Maria a 52°C por 2 horas;
7. Foi adicionado 500µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e agitado em vórtex;
8. A suspensão obtida foi centrifugada 12.000xg por 5 min.;
9. A fase superior (aquosa) foi recolhida em outro microtubo de 1,5mL aproximadamente 300 µL;
10. Foi adicionado o mesmo volume recolhido no item 9 de propanol absoluto;
11. Foi precipitado a -20°C por 2 horas;
12. A suspensão obtida foi centrifugada por 12.000xg por 30 min.;
13. O sobrenadante foi descartado vertendo o tubo cuidadosamente e sedimento foi resuspendido em 500µL de Etanol 70 a 75%;
14. A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000xg por 15 min.;
15. O sobrenadante foi novamente descartado vertendo o tubo cuidadosamente e os tubos foram deixados invertidos sobre um papel absorvente para secar;
16. O sedimento de DNA foi resuspendido em 50µL de TE e agitado em vórtex;

17. A suspensão foi incubada a 52°C por 10 min. e agitada em vórtex;
18. A suspensão final obtida foi centrifugada a 12.000g por 1 min. e estocada a -20°C..

Protocolo 2 – Extração dos parasitos

1. Os meios de cultura contendo as formas promastigotas, foram recolhidos em tubos de microcentrifuga 1,5ml e centrifugados a 500xg por 10 min. A 10°C. O sobrenadante foi descartado.
2. O sedimento foi resuspendido em 500µL de meio Schneider livre de parasitos.
3. 50µL desta suspensão foi diluída em 450µL de meio Schneider livre de parasitos – Suspensão 1.
4. A partir da suspensão 1 foram feitas em réplicas diluições em ordem crescente na base dez usando o meio Schneider como diluente. (Originando as suspensões S2 a S9 e S2' a S9') descritas no item 3.8.2.1.
5. 90µL das suspensões de parasitos (S2 a S9 e S2' a S9') foram ressuspendidas em 500µL do tampão TNE-SDS. Concentração final do tampão TNE-SDS em cada tubo: 10mM TrisHCl pH8,0; 25mM EDTA pH8,0, 100mM NaCl; 1%SDS)*
6. A partir deste item, a extração segue igual do item 5 ao 18 do Protocolo 1

Protocolo 3 – Extração dos parasitos com tecidos – Baço

1. Fragmentos de baço foram triturados e macerados numa relação 20% peso/volume.
2. 100 µL da suspensão foram distribuídos em microtubos, e foram adicionados 1000µL de TE, homogeneizado em vórtex e centrifugados por 12.000xg por 5 minutos, desprezado o sobrenadante vertendo o tubo cuidadosamente; Foi repetido três vezes esta etapa.

3. Neste sedimento resultante foram acrescentados 20µL das suspensões (S2 a S9 e S2' a S9').
4. Após foram ressuspensos em 500µL do tampão TNE-SDS. Concentração final do tampão TNE-SDS em cada tubo: 10mM TrisHCl pH8,0; 25mM EDTA pH8,0, 100mM NaCl; 1%SDS)*
5. A partir desta etapa, a extração segue igual a etapa nº 5 a etapa nº 18 do Protocolo 1.

Protocolo 4 – Extração dos parasitos com tecidos – Medula

1. Aspirados de medula óssea foram diluídos em uma proporção de 20% peso/volume.
2. 100 µL da suspensão foram distribuídos em microtubos, e foram adicionados 1000µL de TE, homogeneizado em vórtex e centrifugados por 12.000xg por 5 minutos, desprezado o sobrenadante vertendo o tubo cuidadosamente; Foi repetido três vezes esta etapa.
3. Neste sedimento resultante foram acrescentados 20µL das suspensões (S2 a S9 e S2' a S9').
4. Após foram ressuspensos em 500µL do tampão TNE-SDS. Concentração final do tampão TNE-SDS em cada tubo: 10mM TrisHCl pH8,0; 25mM EDTA pH8,0, 100mM NaCl; 1%SDS)*
5. A partir desta etapa, a extração segue igual a etapa nº 5 a etapa nº 18 do Protocolo 1.

* Para cada tubo adicionar 5µL de TrisHCl 1M, pH 8,0; 25µL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 10µL de NaCl 5M; 50µL de SDS 10% e 460µL de água ultra-pura