



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

RAFAEL ACIOLI MEDEIROS

**Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em
cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco**

**Recife
2013**

RAFAEL ACIOLI MEDEIROS

Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Profa. Dr. Fabio Lopes de Melo

Departamento de Parasitologia, Laboratório de Doenças Transmissíveis;

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM).

Catalogação na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Medeiros, Rafael Acioli

Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco/ Rafael Acioli Medeiros– Recife: O Autor, 2013.

70 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Coorientador: Fabio Lopes de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia

1. Leishmaniose 2. Cão- doenças 3. Zoonoses I. Carvalho Junior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 213

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO DE
IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Medeiros, Rafael Acioli.

Título: Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 25/02/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prof. Dra. Maria Almerice Lopes da Silva

Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dedico aos meus pais por todo apoio,
ao meus irmãos pela compreensão
e a minha noiva Camila, por todo amor a mim dedicado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos alcançadas e pelo conlusão de mais uma etapa.

Agradeço a minha família por todo esforço, dedicação e amor, estando sempre presentes em cada momento.

Agradeço a minha noiva, Camila Ximenes, com a qual dividi as angustias e felicidades dessa jornada, pelo amor, dedicação, compreensão, por ser sempre meu porto seguro e por fazer com que cada dia te ame e admire mais.

Ao meu orientador Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior pelo conhecimento compartilhado, pelo empenho e pela confiança no meu trabalho para realização dessa pesquisa.

Ao meu co-orientador Dr. Fabio Lopes de Melo, ao qual não tenho nem palavras para agradecer, pelo companheirismo e amizade, além de confiança e dedicação.

Ao Dr. Leucio Alves por toda colaboração, confiança e apoio.

Ao Dr. Carlos Luna pela colaboração

A todos que fazem o Laboratório de Doenças Transmissíveis do CPqAM, em especial ao amigo Leandro, por sua vontade incomparável de ajudar.

Aos amigos que fiz durante o mestrado no LIKA, muito obrigado por tornarem cada dia mais instigante.

Aos meus amigos Pedro, Melo, Eduardo, Victor, José, Dada, João, Marcos, João Rafael por me lembrar sempre o quanto é bom ter amigos e que a música sempre nos conecta de uma forma ou de outra.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães por fornecer a estrutura e todos os equipamentos que foram necessários durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação do Mestrado e a todos os professores, que contribuíram de forma efetiva para minha formação acadêmica, na realização e conclusão dessa pesquisa. À equipe da secretaria acadêmica do curso, por terem sido sempre prestativos.

À Eliete por todos os momentos e conversas que tivemos, pela compreensão e especialmente pela paciência e dedicação ao que faz.

A CAPES por financiar o meu estudo.

A todos aqueles por ventura não mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, muito obrigado!

“Para se ser feliz até um certo ponto é preciso ter-se sofrido até esse mesmo ponto.”
Edgar Allan Poe

MEDEIROS, R. A. **Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco.**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde) – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

RESUMO

As Leishmanioses são uma antropozoonose com ampla distribuição geográfica e ocorrência em torno de 88 países. Na Leishmaniose visceral americana (LVA), os cães domésticos são considerados os principais reservatórios da *L. infantum* no ambiente domiciliar. Diferentes perfis epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) têm sido caracterizados pela presença de casos humanos em áreas de colonizações antigas, sugerindo uma antropozoonose entre os animais domésticos por demonstrarem lesões tegumentares causadas pela Leishmania (Vianna) braziliensis. O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado através de métodos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares. Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico e epidemiológico dessas zoonoses é dificultado pela similaridade clínica com outras doenças, tornando a utilização de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica. Em virtude da necessidade de diagnóstico específico das leishmanioses na espécie canina, este trabalho tem como objetivo a utilização da PCR-RFLP, tendo como alvo o espaçador interno transcrita (ITS-1), para diferenciação das espécies de Leishmania em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife. Foram coletadas 40 amostras de soro e medula de cães, 30 machos e 10 fêmeas, com idades entre 2 e 7 anos, que apresentaram suspeita clínica de leishmaniose quando atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. Foram realizados os testes diagnósticos de exame direto em medula e Reação indireta de imunoflorescência tanto para LTA quanto LVA. Além disso foi realizado a PCR-RFLP nas amostras de soro e urina para a pesquisa de *L. infantum* e *L. (viannia) braziliensis*. Dos 40 cães pesquisados 23 foram positivos para *L. infantum* e 17 foram negativos para as duas espécies pesquisadas. Quando comparado com os testes diagnósticos convencionais, 3 dos 23 cães foram positivos apenas na técnica molecular. Portanto, a ITS1-PCR RFLP pode ser uma importante ferramenta para o diagnóstico e caracterização da leishmaniose canina em uma determinada região.

Palavras Chaves: Leishmaniose canina, PCR – RFLP , Diagnóstico.

MEDEIROS, R. A. **Characterization of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs from the Metropolitan Region of Recife, State of Pernambuco.** 2013. Dissertation (Master's Degree in Applied Biology Health) – Laboratory Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, 2013.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is a anthropozoonosis with broad geographic distribution and occurrence around 88 countries. In American visceral leishmaniasis (AVL), domestic dogs are considered the main reservoir of *L. infantum* in the home environment. Different epidemiological profiles of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) have been characterized by the presence of human cases in areas of ancient settlements, suggesting a anthropozoonosis among domestic animals by demonstrating mucocutaneous lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The diagnosis of leishmaniasis can be performed by using clinical, epidemiological, parasitological, immunological and molecular. In endemic areas the clinical and epidemiological such zoonoses is hampered by clinical similarity to other diseases, making the use of laboratory tests of paramount importance for diagnostic confirmation. Due to the need for specific diagnosis of leishmaniasis in dogs, this study aims to use PCR-RFLP targeting the internal transcribed spacer (ITS-1) for differentiation of *Leishmania* species in dogs from the metropolitan region Recife. We collected 40 samples of serum and spinal dogs, 30 males and 10 females, aged between 2 and 7 years, with clinically suspected leishmaniasis when treated at the Veterinary Hospital of UFRPE. Diagnostic tests were performed on direct examination marrow and indirect immunofluorescence reaction for both LTA as LVA. Furthermore was carried out PCR-RFLP in the serum samples and urine samples for the presence of *L. infantum* and *L. (Viannia) braziliensis*. Of the 40 dogs surveyed 23 were positive for *L. infantum*, and 17 were negative for both species surveyed. When compared with conventional diagnostic tests, 3 of 23 dogs were positive only on molecular technique. Therefore, the PCR-RFLP ITS1 can be an important tool for the diagnosis and characterization of canine leishmaniasis in a specific region.

Key Word: Canine Leishmaniosis, PCR-RFLP, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEORICO

Figura 1: Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no Velho e 20 no Novo Mundo.

Figura 2: Distribuição mundial da leishmaniose Cutânea. 20

Figura 3: Fêmea hematófaga de Lutzomyia sp. 24

Figura 4: Formas evolutivas da *Leishmania*. 25

Figura 5: Ciclo biológico de Leishmania spp.. 26

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da 60 otimização da proporção de iniciadores na ITS-PCR.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 2% para a avaliação da 61 especificidade da ITS1-PCR.

Figura 3: PCR RFLP utilizando os produtos da ITS1-PCR e digestão 62 com a enzima HAEIII.

Figura 4: Resultado da PCR - RFLP. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ETS	Espaçador transcrito externo
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência Indireta
ITS	Espaçador Interno Transcrito
kDNA	DNA do Kinetoplasto
Kg	Quilograma
Kit	Conjunto diagnóstico
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Muco cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo Difusa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
min	Minutos
Mg	Milograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro

OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
pmoles	Picomoles
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RPM	Rotações por minuto
RNA	Acido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
S	Segundo
U	Unidade
US	Ultrasonografia
UV	Ultravioleta
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Histórico	17
2.2 Etiologia	18
2.3 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose	19
2.4 Reservatórios e vetores	20
2.5 Ciclo Biológico e formas de transmissão	21
2.6 Manifestações clínicas das leishmanioses	26
2.7 Diagnóstico	28
2.7.1 Diagnóstico Parasitológico	28
2.7.2 Diagnóstico Imunológico	29
2.7.3 Diagnóstico Molecular	30
2.7.3.1 Alvos moleculares e iniciadores	30
<u>2.7.3.1.1 Minicírculo do cinetoplasto</u>	30
<u>2.7.3.1.2 DNA ribossômico</u>	31
<u>2.7.3.1.3 Subunidade menor do ribossomo</u>	32
<u>2.7.3.1.4 Espaçador interno transcrito</u>	32
<u>2.7.3.1.5 Outras regiões-alvo</u>	33
2.7.3.2 Aplicações da PCR no diagnóstico das Leishmanioses	34
2.8 Tratamento	35
2.9 Controle	36
3 JUSTIFICATIVA	38
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
4 OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo geral	53
4.2 Objetivos específicos	53
5 ARTIGO CIENTÍFICO	54
6 CONCLUSÕES	68

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA), também conhecida como calazar é uma antropozoonose com ampla distribuição geográfica e ocorrência em 88 países (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2006), sendo que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BONATES, 2003; BRASIL, 2006). As Leishmanioses constituem o terceiro conjunto de doenças mais importante causada por vetor, e avalia-se que ao redor do mundo existem anualmente de 1,5 a 2,0 milhões de casos incidentes, com cerca de 350 milhões de pessoas em risco de adquirir a infecção ou doença (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Entre as diversas áreas da Federação Brasileira, a região Nordeste, é a que detém a maior parte dos casos (BRASIL, 2004; ASHFORD et al., 1998).

No Brasil, a doença que era eminentemente rural atualmente passa por um processo de urbanização (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004). Neste contexto, vários perfis epidemiológicos da doença têm sido descrito na dependência do vetor, reservatório, distribuição espacial da enfermidade e espécie (POCAI et al., 1998).

A doença tem como agente causal nas Américas um protozoário da espécie *Leishmania infantum chagasi*, o qual se encontra inserido no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000; FEITOSA et al, 2000), sendo transmitido para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

Os cães domésticos são considerados os principais reservatórios da *L. infantum chagasi* no ambiente domiciliar, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença (FEITOSA, 2000; BRITO et al., 2006), e sua importância está relacionada à frequência e abundância do parasitismo cutâneo, bem como, a alta prevalência da doença na população canina (FEITOSA, 2000).

Nas últimas décadas em função das grandes devastações ambientais através das ações antrópicas e consequente colonização humana, aliada à presença de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, pesquisas ao redor do mundo buscam descobrir os reservatórios primários das leishmanioses, sobretudo da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

Diferentes perfis epidemiológicos da LTA têm sido caracterizados pela presença de casos humanos em áreas de colonizações antigas, sugerindo uma antropozoonose entre os animais domésticos (caninos, felinos e equinos) por demonstrarem lesões tegumentares causadas pela *Leishmania (Vianna) braziliensis*, mas por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo, podem ser considerados hospedeiros secundários da enfermidade (MADEIRA et al., 2003).

SANTOS et al. (2008) , alertaram para existência do ciclo doméstico da transmissão da Leishmaniose Tegumentar, sugerindo cães e equídeos como prováveis reservatórios domésticos para *L. (Viannia) braziliensis*, mas sem, entretanto, descartar a participação dos gatos , além da existência de um ciclo silvestre primário (VEDOVELLO FILHO et al., 2008).

O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado através de métodos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares. Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico e epidemiológico dessas zoonoses é dificultado pela similaridade clínica com outras doenças, tanto no acometimento humano quanto canino (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007), tornando a utilização de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica.

Os métodos moleculares são utilizados na identificação de diferentes espécies de *Leishmania*, através de análises das moléculas de DNA do cinetoplasto (kDNA) ou do DNA nuclear (nDNA), usando diferentes técnicas que variam desde análises como RAPD (random amplified polymorphic DNA) ao RFLP (restriction fragment length polymorphism) de diferentes genes, como espaçadores internos transcritos (ITS) ou não transcritos (NTS) do gene de rRNA, mini-exon, detectados através de testes de reação em cadeia pela polimerase (SHAW et al, 2005).

A técnica de PCR é uma alternativa atraente neste contexto, pois é suficientemente sensível, específica e rápida para atender as necessidades dos programas de controle. Esse diagnóstico vem a suprir algumas lacunas importantes presentes nos métodos tradicionais de diagnóstico (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Por exemplo, permite detectar de maneira específica seqüências exclusivas do genoma do parasito sem necessidade de seu isolamento em cultura, utilizando amostras biológicas diversas (SILVA et al., 2010). Isso representa mais rapidez para geração de resultados, menor custo com mão de obra técnica e maior aceitação pelo paciente. Ainda, abrindo a possibilidade de distinção de espécies de *Leishmania* pela técnica de RFLP-PCR (SILVA et al., 2010), fator importante para o tratamento adequado e para

estudos epidemiológicos na determinação de possíveis medidas de controle, o que não é possível pela visualização microscópica ou análise da resposta humoral.

Em virtude da necessidade premente de diagnóstico específico das leishmanioses na espécie canina, este trabalho tem como objetivo a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Datam do fim do século XIX as primeiras descrições feitas do parasito Leishmania. Borovsky, em 1898, identificou em um paciente com a forma cutânea da doença (REY, 2001). Em 1869, na Índia, a infecção recebeu o nome “kala-jwar” que quer dizer febre negra ou “kala-azar” que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981). Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço extraído de um soldado indiano que havia tido uma febre local conhecida como febre “Dum-Dum” ou “Kala-azar”, porém suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Charles Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente. No mesmo ano, Major Ross nomeou este parasito de Leishmania donovani criando o gênero Leishmania (PRATA; SILVA, 2005). O primeiro relato do parasito no continente americano data de 1931, onde Migone descreve um caso no Paraguai de paciente proveniente do Estado de Mato Grosso, Brasil. Neste país, o primeiro relato de leishmaniose visceral ocorreu em 1934 por Penna que encontrou formas amastigotas de Leishmania em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela (REY, 2001). Em 1936, Evandro Chagas descreveu o primeiro caso in vivo de leishmaniose visceral no Brasil e em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram o seu agente etiológico, denominando-o de Leishmania donovani chagasi (REY, 2001). Em 1908, Charles Nicolle descreve a participação dos cães como reservatórios da leishmaniose através de estudos experimentais, e em 1920 e 1922, Cerqueira e Aragão, respectivamente, comprovam a participação de insetos na transmissão da doença (REY, 2001).

A leishmaniose tegumentar (LT) já era conhecida como um grupo de doenças dermatológicas semelhantes entre si, e sua apresentação clínica era associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas e, por vezes, com comprometimento da mucosa oronasal (PESSÔA; BARRETO, 1948).

No Brasil, Moreira; 1895 identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, chamado “botão da Bahia” ou “botão de Biskra”. Em 1908, houve uma epidemia em Bauru/SP, quando Lindemberg; 1909 e Carini; Paranhos

(1909) correlacionaram a “úlcera de Bauru” com o “botão do Oriente” e o seu agente causal com *Leishmania tropica*.

Vianna; 1911 considerou que havia diferenças morfológicas entre a *Leishmania tropica* e o agente etiológico da leishmaniose cutânea e a chamou de *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, Rabello (1923) criou o termo leishmaniose tegumentar americana (LTA), denominação que abrange tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença.

2.2 Etiologia

As leishmanias são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* é composto por cerca de 30 espécies diferentes (10 presentes no Velho Mundo e 20 no Novo Mundo, das quais cerca de 21 são conhecidamente patogênicas (DANTAS-TORRES, 2006b). O gênero é tradicionalmente dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, tendo como base o desenvolvimento do parasito no intestino do atrópode vetor (MOMEN;CUPOLILLO, 2000). O subgênero *Viannia*, que compreende principalmente as espécies *L.(V)braziliensis*, *L.(V)panamensis* e *L.(V)guyanensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas ou mucocutâneas. O outro é o subgênero *Leishmania*, que compreende as espécies *L.(L)mexicana* e *L.(L) amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localizadas ou difusas, e *L. donovani* e *L. infantum chagasi*, causadora da LV (TAYLOR;COOP;WALL, 2010). Os protozoários desse gênero são responsáveis pelas leishmanioses, um grupo de doenças com diversos padrões epidemiológicos e clínicos de manifestação. Em sua maioria de casos, as leishmanioses são zoonoses, sendo o homem hospedeiro accidental. Além do homem, outros mamíferos constituem reservatórios para diferentes espécies de *Leishmania*, tendo um papel importante na epidemiologia da doença (DANTAS-TORRES, 2007).

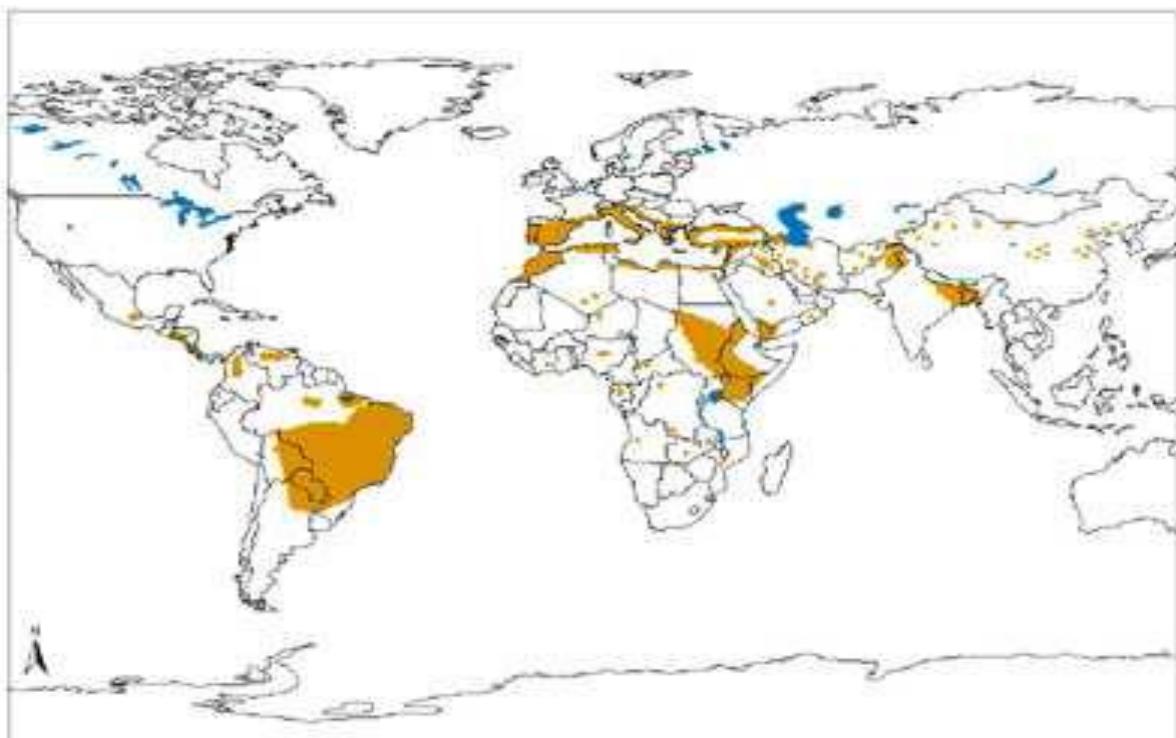
A LVA é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), estando inclusas duas espécies: *L. (Leishmania) donovani* e *L. infantum chagasi*, dependendo da região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania infantum chagasi* na Ásia, Europa, África e nas Américas (BRASIL, 2006). Independente da origem, baseando-se em estudos imunológicos e genéticos, autores consideram que *L. infantum* e *L. chagasi* representam a mesma espécie (DANTAS-TORRES, 2006a; MAURICIO; STOTHARD;

MILES, 2000), outros pesquisadores consideram estas, como subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). Maurício, Stothard e Miles em 2000, afirmam que os dados genéticos e enzimáticos tornam irrefutável a evidência de que *L. infantum*, descrita por Nicolle em 1908 e *L. chagasi*, descrita por Cunha e Chagas 1937 devem ser consideradas sinônimos, tendo prioridade à nomenclatura mais antiga.

2.3 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose

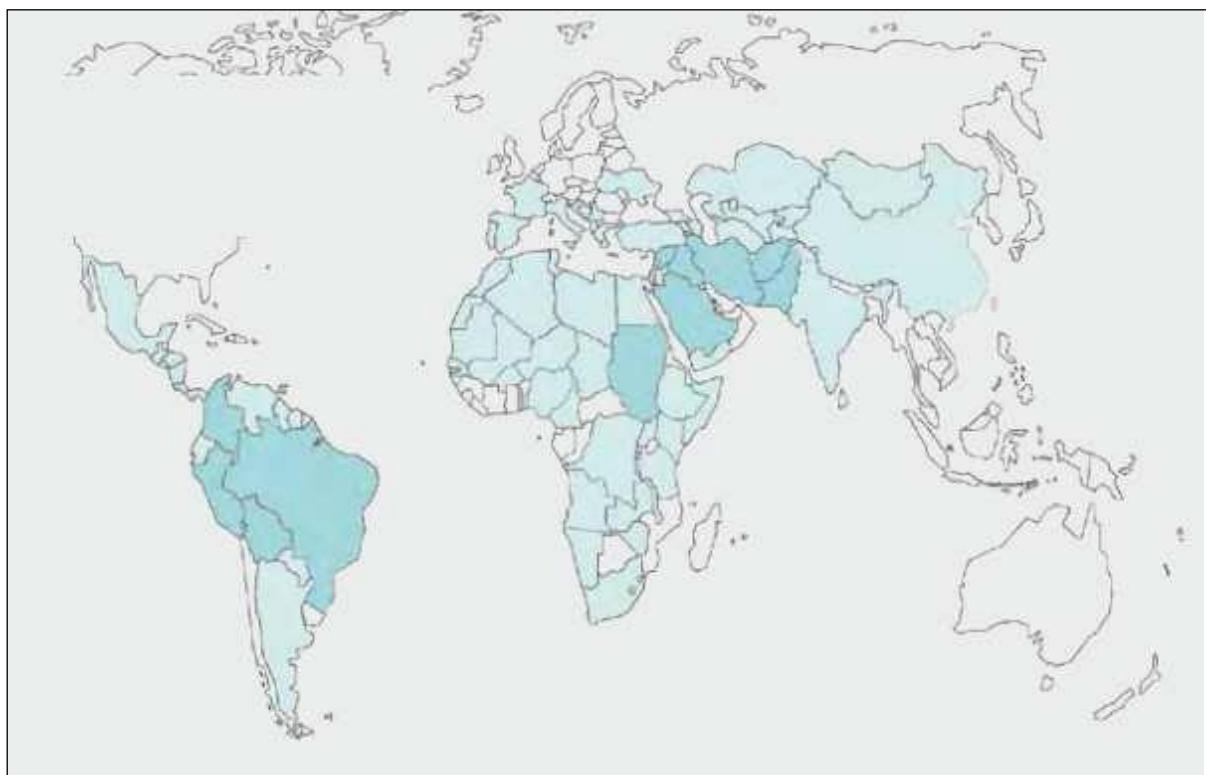
A Organização Mundial da Saúde estima que existam em torno de 12 milhões de casos de leishmaniose em todo mundo, com uma mortalidade anual de 60 mil pessoas, sendo o tamanho da população em risco de 350 milhões (Figura 1 e Figura 2) (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). O número de novos casos por ano de leishmaniose cutânea em todo o mundo é de 1,5 milhões de pessoas e da forma visceral de 500.000 novos casos anualmente, destes mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil (OMS, 2012).

Figura 1: Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no Velho e no Novo Mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010).

Figura 2: Distribuição mundial da leishmaniose cutânea.



Fonte: Organização mundial da saúde (2007)

Nota: Os países em azul mais escuro são responsáveis por mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea.

Em seu contexto epidemiológico as leishmanioses vêm passando por processo de transformação, anteriormente doenças de ambiente silvestre e rural, acometendo pessoas que adentravam em florestas e conviviam em proximidade com animais sinantrópicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008), passam por um processo de urbanização, provocando alterações em sua epidemiologia (MONTEIRO et al., 2005), tornando-se endêmica em ambientes urbanos, altamente zoonótico e considerado sério problema de saúde pública (CAMARGO et al., 2007). Essa urbanização vem ocorrendo por uma adaptação do vetor ao ambiente urbano, devido às alterações sofridas em seu habitat natural (FEITOSA, 2002).

No Brasil, os primeiros relatos de leishmaniose surgiram em regiões do semi-árido nordestino, Estados do Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, nessas regiões a ocorrência está relacionada à presença de animais infectados e a abundância de flebotomíneos (LIMA et al., 2004). Atualmente, a doença encontrasse estabelecida na periferia de cidades de médio e grande porte de vários estados, tais como Pernambuco, Piauí, Minas Gerais, Ceará e Araçatuba (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005, 2006).

Atualmente, a LV é considerada endêmica em 19 estados do país, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis pela maior parte dos casos notificados. Sobretudo nos últimos 20 anos, a doença difundiu-se e tornou-se cada vez mais comum em áreas urbanas ou periurbanas. No Estado de Pernambuco, a situação não parece ser diferente. O paradigma da endemia rural é substituído pelo da doença associada a modificações ambientais, à ocupação desordenada do espaço urbano e às precárias condições de vida da população exposta ao risco. Logo, seja no espaço rural ou urbano, a LV amplia sua área de ocorrência, ultrapassando antigos limites geográficos definidos e tornando-se um sério problema de saúde pública em praticamente todo território pernambucano. De acordo com os dados da SES-PE, foram notificados 1.737 casos de LV em Pernambuco, entre 1990 e 2001. No início do período estudado (1990), apenas 15,2% (n = 28) dos municípios do estado haviam notificado um ou mais casos da doença. Ao final do período (1990-2001), esse percentual elevou-se para 78,3% (n = 144) (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

No Brasil, a LTA tem assegurada a sua distribuição em todo o território, onde, atualmente, todos os Estados federativos têm registros da enfermidade (BRASIL, 2007).

Cinco espécies do subgênero *Viannia* e uma do gênero *Leishmania* estão associadas à doença no país. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie causadora de LTA no Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003) e, até o momento, única circulante em Pernambuco (ANDRADE et al., 2006; BRANDÃO-FILHO et al., 2003). No Estado, a LTA incide em todas as regiões destacando-se a região da Zona da Mata com mais de 60% do total dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Entre 1990 e 2000 foram notificados 3268 casos no Estado, e estima-se que nos últimos dez anos a transmissão da doença tenha aumentado dez vezes (BRITO et al., 2009).

2.4 Reservatórios e vetores

Devido à complexidade das leishmanioses, o conhecimento de seus reservatórios é de extrema importância para determinar o ciclo natural do parasito e da epidemiologia da doença, com algumas exceções as leishmanioses são zoonoses e o homem se infecta accidentalmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Os reservatórios primários das *Leishmania* são mamíferos selvagens, como os roedores e canídeos silvestres (DANTAS-TORRES, 2007; SOBRINO et al., 2008). A doença já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores (BANETH, 2006). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (LAINSON et al., 1990; BRASIL, 2006).

No passado a LVA era descrita como uma doença de ambiente rural, entretanto, as transformações ambientais provocadas pelo intenso processo migratório e o processo de urbanização crescente levaram a uma expansão das áreas endêmicas, com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente (BRASIL, 2006). Por causa desse processo de urbanização, o cão adquiriu grande importância como reservatório da *Leishmania infantum chagasi*, no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem. Os cães, considerados os principais reservatórios domésticos, são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão. Essa importância baseia-se no fato da LVA ser mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e, pelo fato destes apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele do que o homem, o que

favorece a infecção dos vetores (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Em áreas endêmicas a prevalência de leishmaniose em cães é alta, acometendo em torno de 20 a 40% da população (FEITOSA et al., 2000; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; SILVA et al., 2001; ALVAR et al., 2004).

Na forma cutânea a importância do cão como reservatório ainda não está completamente elucidada, atualmente é considerado hospedeiro acidental, servindo como mantenedor do vetor no ambiente e consequentemente do ciclo de transmissão (MADEIRA et al., 2003; DANTAS-TORRES, 2007).

Os insetos vetores são flebotomíneos fêmeas, dípteros, da subfamília *Phlebotominae* (CHAPPUIS et al., 2007) dos gêneros *Phlebotomus* (encontrados no Velho Mundo) e do gênero *Lutzomyia* (encontrados no Novo Mundo) (SANTOS et al., 2008) (Figura 3), e apresentam um comprimento médio de dois a três milímetros, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Dentre as 500 espécies de insetos conhecidas, sabe-se que apenas trinta podem transmitir o parasito (OMS, 2009). Atualmente, no Brasil, a principal espécie de flebotomíneo (Diptera: Psychodidae) incriminada na manutenção do ciclo da doença é *Lutzomyia longipalpis* (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; LAINSON; RANGEL, 2005), havendo suspeita do papel vetorial de outras espécies tais como, *Lutzomyia forattinii* (PITA-PEREIRA et al., 2008). *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul para a LV(BRASIL, 2006; MARCONDES, 2009). Nos últimos anos, tem sido especulada a competência vetorial do *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), o qual já foi encontrado naturalmente infectado, sendo capaz de transmitir, em condições experimentais, os parasitos a roedores, abrindo novas perspectivas na epidemiologia da leishmaniose visceral zoonótica (COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006b).

A LTA, nas Américas, é transmitida entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebótomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*.

Figura 3: Fêmea hematófaga de *Lutzomyia* sp.

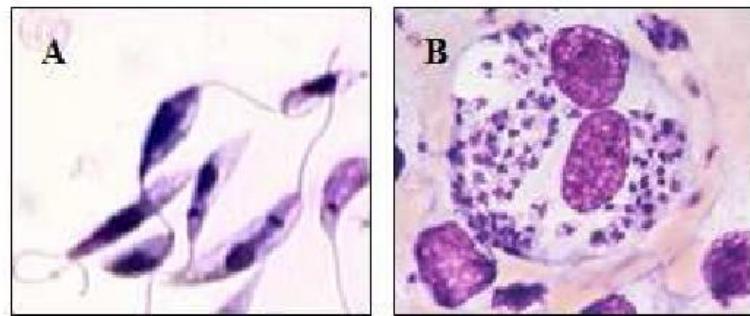


Fonte: UNMSM.EDU.PE

2.5 Ciclo Biológico e formas de transmissão

A transmissão da *Leishmania* inicia-se quando os insetos infectados picam o hospedeiro vertebrado e as formas promastigotas (extracelulares alongadas e flageladas, medindo entre 14 e 20 μm) (Figura 4A) do parasito são regurgitadas e inoculadas. Estas formas possuem mecanismos que lhes permitem resistir à ação de elementos presentes no sangue, principalmente o sistema complemento, e estimular sua adesão e endocitose pelos macrófagos. Em seguida, são fagocitadas por macrófagos e se transformam na forma amastigota (arredondadas, medindo entre 2,1 e 3,2 μm) (Figura 4B), dentro dos fagolisossomos. Esse ambiente, com pH intensamente ácido, estresses oxidativos e proteolíticos, é essencial para a transformação na nova forma, sendo crucial ao sucesso da infecção. Depois de sucessivos ciclos de replicação por divisão binária, as amastigotas podem causar rompimento do macrófago, caindo no espaço intercelular, aonde virão a ser fagocitadas por outros macrófagos e células do sistema fagocítico mononuclear (ALEXANDER et al., 1999; MICHALICK, 2002).

Figura 4: Formas evolutivas da *Leishmania*.

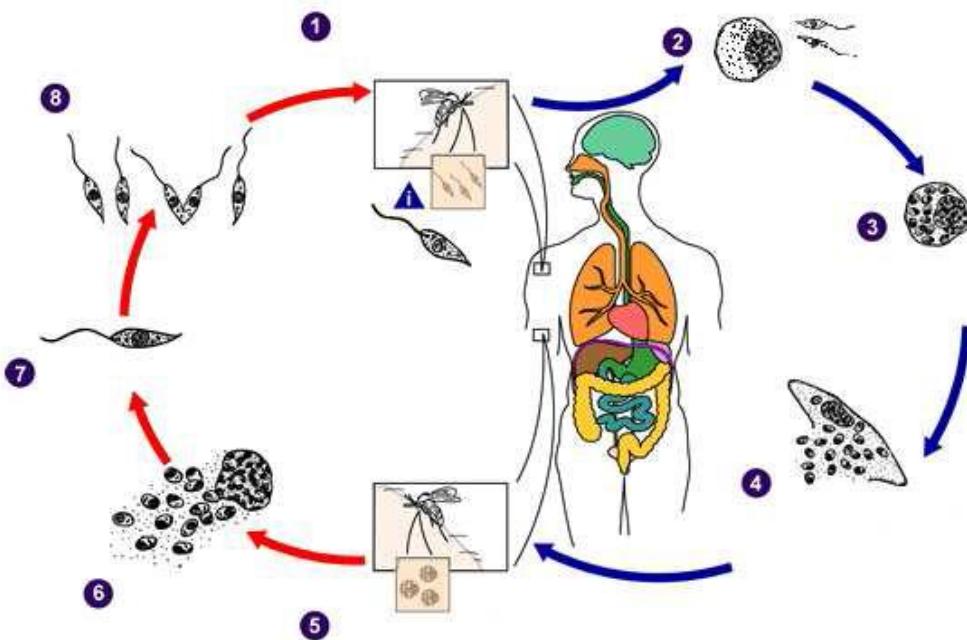


Fontes: Science Photo, 2008; Leish Domus, 2008.

Legenda: (A) Formas promastigotas encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. (B) Formas amastigotas encontradas parasitando os macrófagos do hospedeiro vertebrado.

Durante o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro vertebrado contaminado, os vetores flebotomíneos ingerem paralelamente as formas amastigotas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (BRASIL, 2006). Após este período as fêmeas infectadas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas juntamente com a sua saliva. O ciclo de vida da *Leishmania spp.* , pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5: Ciclo biológico de Leishmania spp.



Fonte: Ciclo Biológico das Leishmanioses, adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2009).

Legenda: 1) Inseto infectado executa o repasto sanguíneo no hospedeiro, injetando promastigotas;2) Promastigotas são fagocitadas por macrófagos;3) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos;4) Macrófagos se rompem, liberando as amastigotas, que infectam outras células;5) Inseto ingere sangue infectado do homem;6) Macrófagos contidos no sangue infectado se rompem, liberando as amastigotas;7) Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto;8) Promastigotas se multiplicam no intestino do inseto vetor; o inseto infectado executa o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo.

Vários estudos têm confirmado outras formas de transmissão: por meio de transfusão sanguínea, de agulhas contaminadas entre usuários de drogas, transplantes de órgãos, infecções laboratoriais (GUERIN et al., 2002), por contato direto (LAINSON; BRAY, 1964).

2.6 Manifestações clínicas das leishmanioses

Em sua classificação, as Leishmanioses consistem em quatro formas clínicas principais Leishmaniose Cutânea; Leishmaniose Muco-Cutânea (também conhecida como Espundia); Leishmaniose Visceral (LV, também conhecida como Calazar); e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL) (CHAPPUIS et al., 2007).

A LTA pode se apresentar clinicamente nas formas cutânea (LC), mucosa (LM) e cutâneo-difusa (LCD) (DA-CRUZ ; PIRMEZ, 2005). A leishmaniose cutânea apresenta uma grande variedade de apresentações clínicas ocorrendo casos assintomáticos que são reconhecidos em inquéritos epidemiológicos, casos com forma subclínica que evoluem para cura espontânea e outros com lesão ulcerativa, indolor restritas no local da inoculação, frequentemente em áreas expostas da pele, presentando formato arredondado ou ovalado, base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações com aparecimento após período de latência de 30 dias, denominada leishmaniose cutânea localizada (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

Alguns pacientes podem desenvolver a leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares que acometem vários segmentos corporais, tendo como espécies causadoras *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.)amazonensis* (BRASIL, 2007). Cerca de 3 a 5% dos pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea desenvolvem lesão mucosa (leishmaniose mucocutânea), após resolução da lesão inicial, acometendo principalmente as vias aéreas superiores acarretando lesões deformantes, secundárias a acometimento cutâneo, tendo como agente desta forma *L (V.) braziliensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

A leishmaniose tegumentar canina apresenta similaridade clínica a do homem, com lesões ulceradas, principalmente encontradas no pavilhão auricular, focinho, face, membro posterior, bolsa escrotal, podendo acometer mucosas, comumente a nasal e oral (MADEIRA et al., 2003).

A LVA é considerada a forma mais grave das leishmanioses, sendo de evolução crônica, sistêmica e fatal se não tratada (SILVA, 2007). As manifestações apresentadas pelo cão e homem doentes são clinicamente similares, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia (FEITOSA et al., 2000). Um dos problemas associados às leishmanioses é a co-infecção com HIV, nesses quadros há uma diminuição na resposta imune celular, tornando o paciente suscetível a diversos agentes infecciosos oportunistas o que agrava o quadro clínico (PRATA e SILVA, 2005; MS, 2006). Por fim, a lesão cutânea leishmaniótica pode ser uma condição que aparece, algumas vezes, como uma complicação de determinadas formas de leishmaniose visceral. É esta variante que tornou-se conhecida como a quarta forma clínica da doença: Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (GRIMALDI JR., 1982).

Na doença canina, de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo cão infectado, pode-se classificá-lo em assintomático, que não apresentam sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomático, onde se observa a presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, onde alguns ou todos sinais comuns da doença são evidentes.(LIMA et al., 2004;BRASIL, 2006).

As alterações dermatológicas são os sinais clínicos mais comuns na leishmaniose visceral canina (FEITOSA et al., 2000; GÁLLEGO, 2004), com cerca de 68% dos cães acometidos apresentando tais alterações (CAVALCANTI et al., 2005). Os sinais dermatológicos podem se iniciar como lesão única, comumente no ponto de inoculação do parasito, ou como lesão múltipla com a disseminação do parasito originando lesões não-pruriginosas, descamação epidérmica e alopecia difusa (GÁLLEGO, 2004).

Segundo Gallego, em 2004, a visceralização da infecção pode iniciar em poucos meses ou levar vários anos para ocorrer, o acometimento visceral o cão tende a tornar-se emaciado, ocorrendo perda de apetite, perda de peso e comumente caquexia (FEITOSA et al, 2000; SILVA et al, 2001). Nas fases mais crônicas da doença ocorre hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, diarréia e hemorragia intestinal, atrofia muscular, e insuficiência renal crônica comumente ocasionando óbito (FERRER, 1999). Doenças oculares, como conjuntivite, blefarite, uveíte, são observadas em cerca de 24,4 a 80,49% dos cães doentes (BRITO et al., 2006).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de maior confiabilidade para confirmação da doença podendo ser realizado através de exames diretos, com a demonstração direta do parasito em citologia e cortes histológicos. Para leishmaniose visceral é utilizado o aspirado de medula óssea, linfonodo, baço, fígado (BRASIL, 2007; GOMES et al., 2008). No entanto, essas punções são procedimentos invasivos que exigem profissionais treinados e ambientes apropriados para a coleta. Há uma carência de profissionais para realização deste diagnóstico, e a maioria dos casos é concluída baseando-se apenas nos critérios clínicos e epidemiológicos (BRASIL, 2009). Porém, a demonstração do parasito – ou de vestígios desse – se faz necessária,

principalmente porque os sinais clínicos na LV são iguais ou semelhantes àqueles observados em outras enfermidades ou condições de saúde como, por exemplo, malária, esquistossomose, tripanossomíase africana, febre tifóide e má nutrição (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). A especificidade desses métodos é de 100% (DOURADO et al., 2007; GONTIJO; MELO, 2004), mas a sensibilidade é muito variável, dependendo do tipo de aspirado utilizado (ASSIS et al., 2009; CHAPPUIS et al., 2007), sendo o aspirado do baço a técnica mais sensível, porém de alto risco, assim o aspirado de medula óssea é a forma recomendada pelo Ministério da Saúde nos Sistemas de Saúde, tendo sensibilidade de aproximadamente 80% (BRASIL, 2006). Nos casos na leishmaniose tegumentar é realizado o *imprint* de fragmentos teciduais (BRASIL, 2007). Embora essa técnica seja específica, pois evidencia as formas amastigotas do parasita, é necessário um profissional treinado para realizá-la, além de apresentar sensibilidade inversamente proporcional à carga parasitária presente na lesão (BAILEY; LOCKWOOD, 2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Como métodos indiretos podem-se utilizar o isolamento em cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirado de tecidos em meio bifásico Novy-Mac-Neal-Nicole (NNN) obtendo-se crescimento de formas promastigotas após cinco dias. A inoculação em animais de laboratório, mais comumente hamsters, tem sido utilizado em estudos experimentais (Ikeda-GARCIA E FEITOSA, 2006; GOMES et al., 2008). Este método é importante para a confirmação do agente etiológico através da identificação da subespécie de *Leishmania* envolvida, por análise de zimodemas (isoenzimas) e por sequenciamento de DNA (BAILEY; LOCKWOOD, 2009).

2.7.2 Diagnóstico Imunológico

Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2007) a imunofluorescência indireta não deve ser utilizado como critério isolado para diagnóstico de leishmaniose tegumentar devendo ser associado à Intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou técnicas parasitológicas, devido a reação cruzada com outras doenças como leishmaniose visceral, doença de Chagas, pênfigo foliáceo, esporotricose, paracoccidioidomicose e em pacientes sadios, questionando a sua utilização no diagnóstico da mesma. Têm sido desenvolvidos trabalhos utilizando a técnica de citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose (ROCHA et al., 2002; CARVALHO NETA et al., 2006; MAIA e CAMPINO, 2008). De acordo com Carvalho

Neta et al. (2006) os estudos sorológicos baseados na citometria de fluxo constituem um campo de grandes possibilidades de crescimento devido à sensibilidade de detecção aumentada em relação a outros métodos, podendo evidenciar os casos de leishmaniose tegumentar e visceral em atividade clínica, o que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais (ROCHA et al., 2002).

Uma ampla gama de métodos sorológicos está disponível para o diagnóstico da leishmaniose visceral (SINGH; PANDEY ; SUNDAR , 2006). Entre as diversas técnicas sorológicas empregadas, a Imunofluorescência Indireta (IFI) é um dos mais utilizados no Brasil (GONTIJO; MELO 2004), pois kits comerciais para IFI são fornecidos sem custo pelo Ministério da Saúde. A IFI possui limitações, em termos de especificidade e reproduzibilidade (SUNDAR; RAI, 2002), podendo apresentar reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (SUNDAR; RAI, 2002). O ELISA é um teste mais sensível (GONTIJO; MELO, 2004) e pode usar antígenos recombinantes muito sensíveis, tais como rK39 (SINGH, 2003). O teste de aglutinação direta (DAT) é simples, barato e altamente específico e sensível. Embora o DAT para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral tenha uma alta sensibilidade e especificidade ainda possui algumas limitações, como o tempo de incubação relativamente longo (18 h) e à necessidade de diluições seriadas de sangue ou soro. (SILVA; STEWART; COSTA, 2005).

2.7.3 Diagnóstico Molecular

2.7.3.1 Alvos moleculares e iniciadores

2.7.3.1.1 Minicírculo do cinetoplasto

O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês kinetoplaste) representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, concatenadas, divididas em maxicírculos e minicírculos (TELLERIA et al., 2006). São cerca de 50 maxicírculos (com 20000 a 35000 pb), que contem genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos são no número de 10000 a 20000, com sequências de 500 a 2500 pb (CORTES et al., 2008). O minicírculo kDNA é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico de calazar. Sua vantagem está no fato do grande número de cópias por célula.

Os iniciadores desenhados por Le Fichoux e colaboradores em 1999, os mais aplicados na amplificação do minicírculo do kDNA. A região amplificada é a LT1, que apresenta uma sequência de 145 pb, e os sistemas desenvolvidos já foram aplicados com sucesso na identificação de *Leishmania* em amostras de medula, sangue, soro e urina, de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (JUNIOR et al., 2009; MARY et al., 2004; MARY et al., 2006; FAKHAR et al., 2008; MOTAZEDIAN et al., 2008).

Muitos outros primers foram desenvolvidos nessa última década para pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando como alvo o kDNA (BRUSTOLONI et al., 2007; ASSIS et al., 2009). Esse alvo possui uma considerável heterogeneidade o que pode acarretar em perda da acurácia do ensaio, o que não é observado em outros alvos moleculares (MARY et al., 2004). Na aplicação de enzimas de restrição ao kDNA (PCR-RFLP), essa heterogeneidade dificulta a construção de padrões por RFLP devido ao grande número de fragmentos restritos, restringindo a utilização dos iniciadores entre isolados próximos ou apenas permite a identificação de grupos ou isolados de mesma área.

2.7.3.1.2 DNA ribossômico

O DNA ribossômico (rDNA) possui unidades repetidas ou em tandem dentro da região nucleolar. Nas células eucarióticas, há cerca de 100 a 500 cópias do gene rDNA no genoma nuclear, onde cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – External Transcribed Spacer), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de rRNA 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS (MATEUS et al., 2006).

Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, sendo este alvo um dos mais explorados na identificação de espécies. (SILVA et al., 2010.)

2.7.3.1.3 Subunidade menor do ribossomo

Os genes codificantes do RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) apresentam múltiplas cópias e são bem conservados para o gênero em estudo, permitindo o desenho dos iniciadores. Esse alvo não apresenta o problema de heterogeneidade do kDNA, podendo a informação discriminatória do segmento variável ser acessada por sequenciamento ou por hibridação, produzindo resultados positivos pela PCR, independente da linhagem, grupo ou espécie (FLOETER-WINTER, 2010). Uma desvantagem na aplicação desse alvo é que relações filogenéticas não podem ser esclarecidas (ULIANA et al., 1991).

Os primers R221, R332, R223 e R333 apresentados por Van Eys e colaboradores em 1992, são os mais descritos na amplificação de regiões do SSU-rRNA, produzindo fragmentos de 600 – 650 pb dependendo da espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al., 2003). Os estudos apontam um desempenho satisfatório desses primers nas PCRs desenvolvidas, ao serem comparados com a pesquisa direta do parasito e sorologia (ANTINORI et al., 2007; STARK et al., 2006; SALAM et al., 2009), assim como no monitoramento pós-terapêutico de pacientes imunocomprometidos (LACHAUD et al., 2000, LACHAUD et al., 2001). A Nested-PCR utilizando os pares R221/R332 na primeira reação e R223/R333 na segunda reação detectou 0,01 promastigota (CRUZ et al., 2002). Esta abordagem foi superior às técnicas convencionais em pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania* (CRUZ et al., 2002) e em crianças imunocompetentes (CRUZ et al., 2006).

Na análise pela ferramenta primer-BLAST, todos os iniciadores citados para o SSUrRNA podem também amplificar esse alvo em outros tripanossomatídeos, produzindo bandas de tamanho similar aos amplificados com o gênero *Leishmania*. Tal fato pode indicar um problema no uso desse ensaio em áreas co-endêmicas para esses parasitos, podendo resultar, por exemplo, em reação cruzada com doença de Chagas (SILVA et al, 2010).

2.7.3.1.4 Espaçador interno transcrito

O espaçador interno transcrito (ITS) é uma região não codificante encontrada no SSUrRNA, onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8s, enquanto o ITS-2 pelos genes 5.8S e 28S. Esse espaçador tem sido descrito na identificação de espécies de

Leishmania e de suas linhagens através da PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2003). Os pares de iniciadores mais utilizados na amplificação da região ITS são LITSR e L5.8S, que reproduz o ITS-1 com produto de 300 – 350 pb, e LITSV e L5.8SR, para o ITS-2 com produto de 700 pb (SCHÖNIAN et al., 2003; BHATTARAI et al., 2010). A ITS-1 PCR apresentou bons resultados em amostra de sangue, aspirado de medula ou esfregaços de lâminas coradas com Giemsa (ALAM et al., 2009; BHATTARAI et al., 2010; KAZEMI-RAD et al., 2008). Esses primers parecem ser específicos para o gênero Leishmania, pois não produz bandas frente a DNA de *T. cruzi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Typhophywn terrestre* e *Microsporum audouini* (BHATTARAI et al., 2010). Porém, utilizando a ferramenta primer-BLAST, observa-se que esses iniciadores podem amplificar regiões de outros tripanossomatídeos, inclusive *T. cruzi*, com produtos que variam de 300 – 760 pb de tamanho (SILVA et al., 2010).

2.7.3.1.5 Outras regiões-alvo

Os microsatélites são locus polimórficos presentes no DNA nuclear amplamente distribuídos nas células eucarióticas e que apresentam sequências simples repetitivas (SSR), composta por 1 a 4 nucleotídeos, que geralmente não excedem 200 pb (BECKMAN; WEBER, 1992). Rossi e colaboradores em 1994, identificaram 3 seqüências de microsatélites no genoma de Leishmania: (CA)_n, (GAC)_n e (GGT)_n. Segundo Ferreira & Grattapaglia em 1998, a utilização dessa região em PCR oferece uma completa cobertura do genoma, sendo úteis para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. O polimorfismo nos microsatélites é simples e facilmente detectado pela PCR, com boa reproduzibilidade e discriminação, podendo ser usado para diferenciar relapsos ou re-infecção em pacientes com múltiplos episódios de LV (KUHLS et al., 2007; SERIDI et al., 2008).

As Heat Shock Proteins (HSPs) ou proteínas do choque térmico são identificadas como os principais imunógenos em várias doenças infecciosas (ARORA et al., 2008), sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com LV (ARORA et al., 2000). Após mapeamento de HSP70 cDNA (ARORA et al., 2000; ARORA; MELBY; SEHGAL, 1995), abordagens com PCR foram feitas utilizando os primers Hsp70sen e Hsp70ant (GARCIA et al., 2004). Um produto de 1300 pb foi amplificado com estes parasitos, o mesmo encontrado com o DNA de *T. cruzi*, mas nenhum produto foi

observado com *M. tuberculosis* ou *Sporothrix schenckii*. Desta forma, falsos positivos podem ser obtidos em pacientes chagásicos (SILVA et al, 2010.).

A gp63 é a principal glicoproteína presente na membrana celular de *Leishmania* sp, desempenhando papel fundamental na virulência do parasito e na estimulação da mesma quanto à resposta celular e humoral do hospedeiro (HOYA et al., 1999). Devido ao polimorfismo dessas regiões gênicas, os produtos de amplificação podem ser distintos entre *L. infantum* e *L. donovani*, podendo-se aplicar a identificação de espécies e/ou linhagens pela restrição dos fragmentos (ELAMIN et al., 2008).

Outro alvo estudado recentemente é a região gênica que codifica o antígeno K26, uma proteína hidrofílica de superfície. O par de iniciadores K26f/K26r mostrou-se específico para o complexo *L. donovani*, com produtos que variam de 284 – 1300 pb, discriminando entre *L. infantum* e *L. donovani* (HARALAMBOUS et al., 2008).

Os genes nucleares do mini-exon estão presentes nas células do gênero *Leishmania* e em outros cinetoplastídeos, mas ausente nos mamíferos e vetores. Estão presentes nessas células em número de cópias de 100-200 tandem, separados por genes transcritos e não transcritos. A região transcrita é composta pelo exon altamente conservado com 39 nucleotídeos, e o intron, moderadamente conservado, variando no tamanho entre as espécies do mesmo gênero ou subgênero (MARFURT et al., 2003). Utilizando os iniciadores S-1629 e S-1630 para as espécies do complexo *L. donovani*, todas apresentam um produto de aproximadamente 450 pb (KATAKURA et al., 1999). Bons resultados para diferenciação das espécies em amostras clínicas foram alcançados nas pesquisas onde o alvo da RFLP-PCR era a região dos miniexons (MARFURT et al., 2003)

2.7.3.2 Aplicações da PCR no diagnóstico das Leishmanioses

As abordagens moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui uma das ferramentas promissoras para o diagnóstico das leishmanioses (BRUSTOLONI et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2006), por esta técnica apresentar alta sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2006), podendo ser utilizada no diagnóstico diferencial de Leishmaniose antes do tratamento (REITHINGER; DUJARDIN, 2007), na reavaliação de casos controversos (SCHONIAN et al., 2003) e para a detecção de infecções assintomáticas ou não provadas parasitologicamente (ASHFORD et al., 1995; QUINNELL et al., 2001; AOUN et al., 2009).

A PCR permite a identificação do DNA do parasito em diversas amostras biológicas, tais como medula óssea, baço, linfonodos e sangue periférico (MOADDEB; BEHZAD-BEHBAHANAI, 2008; DOURADO et al., 2007). Porém, os resultados da PCR podem variar muito de acordo com o tipo de amostra utilizada, metodologia usada na purificação do DNA e região-alvo escolhida para amplificação (BRASIL, 2004).

Pode ainda ser utilizada em amostras de tecidos que foram submetidos à avaliação histopatológica ou à técnica de imunohistoquímica e onde não foi possível a identificação do parasita. As amostras de tecidos fixadas em formol e incluídas em parafina são um importante recurso para estudos moleculares, embora a rotina histopatológica possa causar a degradação do DNA nos tecidos (COOMBS, 1999).

Além da possibilidade de utilizar várias amostras clínicas, a PCR apresenta como outras vantagens a habilidade de trabalhar com pequenas quantidades de material a ser analisado e ser capaz de detectar níveis baixos de parasitas nas amostras (MELO, 2004). Diante do exposto a PCR parece ser a técnica que mais se aproxima do ideal, pois com o uso de iniciadores apropriados a sensibilidade e a especificidade da técnica pode se aproximar de 100% (MARQUES et al., 2001, CORTES et al., 2004).

Em cães, além da PCR convencional (IKONOMOPOULOS et al., 2003; REALE et al., 1999; STRAUSS-AYALI et al., 2004; LEITE, 2010), a PCR em tempo real tem sido avaliada em pesquisas recentes e os resultados são promissores (FRANCINO et al., 2006; MORTARINO et al., 2004; PENNISI et al., 2005).

2.8 Tratamento

As drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral humana são os antimoniais pentavalentes. O antimoniato N-metil glucamina é distribuído pelo Ministério da Saúde para este fim. A dose recomendada no tratamento é de 20 a 40mg//kg/dia na LV e de 10 a 20 mg/kg/dia na leishmaniose tegumentar, por via parenteral, endovenosa ou intramuscular. (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

O Ministério da Saúde não recomenda o tratamento de cães com leishmaniose tegumentar e visceral, pois tais tentativas não diminuem a importância do mesmo como reservatório do parasito, apresentando baixa eficácia, induzindo a remissão temporária dos sinais clínicos, no entanto, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito imitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (BRASIL, 2006).

2.9 Controle

O programa de controle adotado no Brasil baseia-se em três principais estratégias: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, inquéritos sorológicos com eutanásia dos cães positivos, e vigilância entomológica. As medidas adotadas relacionam-se com a classificação das áreas com e sem transmissão vetorial (BRASIL, 2004). Tais estratégias de controle não têm sido capazes de reduzir a incidência dos casos humanos (COSTA; VIEIRA, 2001). O diagnóstico precoce e a rápida instituição do tratamento são importantes para o indivíduo e para a comunidade. Pacientes não tratados atuam como reservatórios e contribuem para a transmissão antroponótica (CHAPPUIS et al., 2007). As perspectivas de controle são dependentes do progresso em pesquisas para se obter melhores alternativas e estratégias de gerenciamento dos casos e controle dos vetores (DESJEUX, 2004). Uma das medidas de controle preconizada pelo Ministério da Saúde para prevenção da leishmaniose visceral e praticada por muitos anos é a eutanásia dos cães soro reagentes para leishmaniose (IKEDA et al., 2003). Essa medida foi enfatizada como a principal estratégia para o controle da doença (PRATA; SILVA, 2005). Trabalho realizado por Costa, Tapety e Werneck (2007) demonstrou uma maior diminuição na incidência da infecção quando se realizou a eliminação canina em comparação com a borrifação de anexos, associada ou não com a eliminação canina.

Trabalhos atuais discutem as fragilidades dos programas de controle e o desconhecimento ou o conhecimento insuficiente da biologia do agente etiológico (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; SHAW, 2007), assim, a leishmaniose está se tornando uma doença global. Segundo Shaw (2007), apenas quando for obtido um melhor entendimento da diversidade genética da *Leishmania* spp e dos reservatórios envolvidos no ciclo enzoótico de cada espécie será possível avaliar qual o método ou métodos de controle mais eficazes.

Na leishmaniose tegumentar não são recomendadas ações objetivando o controle dos animais domésticos com a doença, tendo em vista o caráter de hospedeiro acidental desses animais, sendo recomendado eutanásia dos cães infectados doentes quando ocorrer agravamento clínico do mesmo (BRASIL, 2007). No entanto o encontro de co-infecção natural entre *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum chagasi* em cão residente em área endêmica (MADEIRA et al., 2003) reforça a importância de métodos diagnósticos que diferenciem as espécies envolvidas na infecção canina e humana.

O conhecimento gerado com as pesquisas direcionadas para o entendimento da susceptibilidade e expressão da doença (BLACKWELL; MOHAMED; IBRAHIM, 2004), interação hospedeiro-parasito, imunidade anti-leishmania e vacina em desenvolvimento (COLER; REED, 2005; MURRAY et al., 2005), bem como o seqüenciamento do genoma de *L. infantum* (PEACOCK et al., 2007) e do vetor *Lutzomyia longipalpis* (DILLON et al., 2005), certamente irão contribuir para o surgimento de novas estratégias e ferramentas para o controle da enfermidade. Esses conhecimentos são essenciais para remover a Leishmaniose da lista de doenças negligenciadas; entretanto, tais esforços terão um impacto limitado se estas ferramentas não forem acessíveis a todos os pacientes (CHAPPUIS et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses, doenças endêmicas registradas em países do Velho Mundo e do Novo Mundo, são doenças infecciosas que acometem humanos e outros vertebrados, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por dípteros da subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* sp. e *Lutzomyia* sp.). Tais doenças são importantes pelo impacto que produzem na saúde pública e nas implicações econômicas que geram, apresentando alta incidência, letalidade, constituindo em sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho (BORASCHI; NUNES, 2007), sendo consideradas doenças negligenciadas e em expansão no Brasil.

Essas zoonoses vêm apresentando ampla distribuição geográfica, sendo registrada em áreas consideradas, previamente como não endêmicas, passando de doenças de ambiente silvestre e rural, que acometiam pessoas que adentravam em florestas, para doenças de ambiente urbano, associada a adaptação do vetor a estes locais. Diversos mamíferos podem se infectar com *Leishmania* sp., no entanto, com a urbanização das leishmanioses, o cão adquiriu grande importância como reservatório da leishmaniose visceral, no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem, elevada ocorrência de infecções inaparentes e intenso parasitismo cutâneo, representando uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem. Na forma cutânea a importância do cão como reservatório ainda não está completamente elucidada, sendo considerado atualmente hospedeiro acidental, mantendo o vetor no ambiente e consequentemente o ciclo de transmissão.

A pesquisa de alternativas diagnósticas mais sensíveis e específicas é prioritária para auxiliar a prevenção, vigilância e controle das leishmanioses. O investimento em procedimentos de diagnóstico vem sendo apontado como necessário para redução da morbidade e da mortalidade causadas pelas Leishmanioses, bem como para a diminuição dos riscos de transmissão. Tendo em vista que na leishmaniose tegumentar não são recomendadas ações objetivando o controle dos animais domésticos com a doença, tendo em vista o caráter de hospedeiro acidental desses animais, sendo recomendado eutanásia dos cães infectados doentes quando ocorrer agravamento clínico do mesmo (BRASIL, 2007). E o encontro de co-infecção natural entre *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum chagasi* em cão residente em área endêmica (MADEIRA et

al.,2003) reforça a importância de métodos diagnósticos que diferenciem as espécies envolvidas na infecção canina e humana.

Em virtude dessa necessidade este trabalho tem como objetivo a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M.Z.; SHAMSUZZAMAN, A.K.M.; KUHLS, K.; SCHÖNIAN, G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.14(5), p.499–503, 2009.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, London, p.112, v. 2993-3002, 1999.
- ALMEIDA MAO, JESUS EEV, SOUSA-ATTA MLB, ALVES LC, BERNE MEA, ATTA AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, p. 227-232, 2005.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; 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**, Amsterdam, v. 140, p. 231–238, 2006.
- ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; et al. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago , v.44, p.1602–10, 2007.
- AOUN O. et al. 2009. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.166, n.1, p.27-31, 2009.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.
- ARORA, S.K.; GUPTA, S.; BHARDWAJ, S.; SACHDEVA, N.; SHARMA, N.L. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v.102 , p.41—45, 2008.
- ARORA, S.K.; MELBY, P.C.; SEHGAL, S. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein 70 of *Leishmania donovani*. **Immunology and cell biology**, Adelaide, v.73, p.446—451, 1995.

ARORA, S.K.; KAUR, D.; SEHGAL, S.; DATTA, U. Identification of sero-specific epitope of recombinant heat shock protein (HSP70) of *Leishmania donovani*. **Journal of Parasitic Diseases**, v.24, p.21—26, 2000.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; Freire, M.; MIRANDA, J.C. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 53, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, R.W. The leishmaniases. In: PALMER, S.R., SOULSBY, L., SIMPSON, D.I.H. **Zoonoses**. Oxford,Cap.43, p.527-543,1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 12/13, p. 1269-1281, 2000.

ASSIS, T.S.M.; CALIGIORNE, R.B.; ROMERO, G.A.S.; RABELLO, A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London,v. 103, p.1269—1272, 2009.

AZEVEDO E.M.R et. al. Estudo da leishmaniose visceral canina no município de goiânia, Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v.40 (2), p.159-168, 2011.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 25, p. 203-211, 2009.

BANETH, G. **Leishmaniases**. In: GREENE, C.E. Infectious Diseases. 3ed. Canada: Elsevier, p.686-689, 2006.

BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo,v.7, p.328-37, 2004.

BECKMAN, JS, WEBER, JL. Survey of human and rat microsatellites. **Genome**, Ottawa, v.12 (4), p.627-311, 1992.

BHATTARAI, N.R.; DUJARDIN, J.C.; RIJAL, S.; DE DONCKER, S.; BOELAERT, M.; VAN DER AUWERA, G. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. **Parasitology**, London, v.29, p.1-11, 2010.

BLACKELL, J. M.; MOHAMED, H. S.; IBRAHIM, M. E. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, p.268-74, 2004.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, Rio de Janeiro, ano 10, n.61, p.4 - 5, Jan/Fev. 2003.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, n.71, p. 44-48, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2005**. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2012.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 120 p. 2004.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 184 p. , 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2008**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2008LV.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2009a.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; LAUS, J. L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina – revisão. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, n. 64, p. 68-74, 2006.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Malden, v. 14, n. 10, p.1-9, 2009.

BRUSTOLONI, Y.M.; LIMA, R.B.; CUNHA, R.V.; DORVAL, M.E.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.L.L.; PIRMEZ, C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102 (4), 497-500, 2007.

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

CARAVACA, F. et al. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 11, p. 350-352, 1991.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Evaluating Diagnostics**, v.5, p. S7-S16, 2007.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de “l’ulcera de Bauru” avec le Bouton d’Orient. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, [S. l.], v. 2, p. 255-257, 1909.

CARVALHO NETA, A. V.; ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte ,v. 58, n. 4, p. 480-488,2006.

CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; DA SILVA, L. B. G.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, n. 58, p. 36-42, 2005.

COLER, R. N.; REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 244-49, 2005.

COOMBS, N.J.; GOUGH, A.C.; PRIMROSE, J.N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic acids research**, London, v. 27, n. 16, p.12, 1999.

CORTES, S.; ROLAO, N.; RAMADA 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 iniciadores. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, p. 12-17. 2004.

CORTES, S.J.C. **Diversidade genética da população parasitária de Leishmania em Portugal** [thesis]. Lisboa:UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA. 163 p, 2008.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n.4, 2007.

COUTINHO, M.T. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1/2, p.149-155, 2005.

CRUZ, I. et al. Nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human

immunodeficiency Virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v.96 (1), p.S1/185-S11189, 2002.

CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; NIETO, J.; BAILO, B., CAÑAVATE, C., FIGUERAS, M.C., ALVAR, J. Comparison of New Diagnostic Tools for Management of Pediatric Mediterranean Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, p. 2343–2347, 2006.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus Leishmania pathogenic to man Leishmania chagasi n. sp previous note. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

DA-CRUZ, A. M. e PIRMEZ, C. Leismaniose Tegumentar Americana. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro, v.1, p. 698-712, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, supl., p. 411-412, mar. 2005.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. **Epidemiologia da Leismaniose Visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Recife, 96p.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 219-221, 2006b.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 352-356, jul./ago. 2006a.

DEANE, L.M. Leismaniose visceral no Brasil. **Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará**. Rio de Janeiro. Serviço Nacional Educação Sanitária, 1956.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v.27, p.305- 318, 2004.

- DILLON, R.J. et al. A functional genomics project for the investigation of sandfly-*Leishmania* interactions. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, v. 82, p.39, 2005.
- DOURADO, Z. F. et al. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 205-214, 2007.
- ELAMIN, E.M. et al. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v.102, p.54—57, 2008.
- FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; ASGARI, Q.; KALANTARI, M.; MOHEBALI, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.102 (7), p.1–7, 2008.
- 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**, Rio de Janeiro, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. Boletim informativo – INTERVET PET, 15 p, 2002.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the international Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, p. 6-10, 1999.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Editora Embrapa-Brasil, 1998.
- FERREIRA EC, LANA M, CARNEIRO M, REIS AB, PAES DV, SILVA ES, SCHALLIG H, GONTIJO CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.146, p.235-241, 2007.
- FLOETER-WINTER, L.M. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. **BEPA** 2010; 7(73) online, acessado em 03/05/2010.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 214-221, 2006.
- GÁLLEGOS, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmanioses. **Review Scientific and Technical Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.
- GARCIA, L. et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. **Journal of clinical microbiology**, Washigton, v.42(5) , p.2294–2297, 2004.

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. 175, p. 45-52, 2008.

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUERIN, P.J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GRIMALDI JR. G.; Leishmanioses Tegumentares: Aspectos Clínicos e Imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 195 - 215 1982.

HARALAMBOUS, C.; ANTONIOU, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J.; SOTERIADOU, K. Development of a molecular assay specific for the Leishmania donovani complex that discriminates *L. donovani*/Leishmania infantum zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v.60, p.33-42, 2008.

HOYA, R.D.; TRUJILLO, C.E.; CARDENAS, C.; PUENTES, F.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. *Leishmania panamensis*: a 44bp Deletion in gp63 Gene is Found in cDNA and Genomic Libraries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94(5), p.641-643, 1999.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, n.62, p. 32-38, 2006.

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

JUNIOR, M.S.C.L.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; MATOS, M.F.C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42 (3), p.303-308, 2009.

KATAKURA, K. et al. *Leishmania* Mini-exon Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis in China and Ecuador. **Tokai journal of experimental and clinical medicine**, Tokyo, v.23 (6), p.393-399, 1999.

KAZEMI-RAD, E.; MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; REZAEI, S.; MAMISHI, S. Diagnosis and Characterization of Leishmania Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. **Iranian J Public health**, Geneva, v.37(1), p.54-60, 2008.

- KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCHE, C.; PRESBER, W.; SCHÖNAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, p.334-343, 2007.
- LAISON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A.A.; SILVEIRA, F.T. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135 -137, 1990.
- LAINSON, R.; BRAY, R.S. Transmission of *Leishmania mexicana* among laboratory hamsters in the absence of an insect vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 58, p. 287, 1964.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.8, p.811-827, 2005.
- LACHAUD, L.; DEREURE, J. ; CHABBERT, E. ; REYNES, J. ; MAUBOUSSIN, J. ; OZIOL, E. ; *et al.* Optimized PCR Using Patient Blood Samples For Diagnosis and Follow-Up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38(1), p.236–240, 2000.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39 (2), p.613–617, 2001.
- LE FICHOUX, Y. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, 1999.
- LEITE, R.S. et al. PCR Diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology** ,Amsterdam, v.170, p. 201-206, 2010.
- LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M., MELO, M. N., TAFURI, W. L., TAFURI, W. F. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, p.43-53, 2004.
- LINDEMBERG, A. L’ulcère de Bauru ou le bouton d’Orient au Brésil. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** [S. l.], v. 2, p. 252-254, 1909.
- MADEIRA, M.F., UCHÔA, C.M.A., LEAL, C.A., SILVA, R.M.M., DUARTE, R., MAGALHÃES, C.M., SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.30, p.551-555, 2003.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, p. 274-287, 2008.

MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. São Paulo: Editora Atheneu, 557 p. 2009.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; ROMANHA, A.J. Simple form clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore , v.65, p.902-906, 2001.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.41, n.5, p.61-84, 1981.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal of Clinique Microbiology**, London, p. 5249–5255 ,2004.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore , v.75(5), p.858–863 ,2006.

MAURICIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N.D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v.46, p.115–124, 2003.

MATEUS, R.P.; CERON, C.R.; MACHADO, L.P.B.; SENE, F.M. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do dna ribossômico nas espécies do *Cluster buzzatii* de *Drosophila* (Diptera: drosophilidae). **Ambiência Guarapuava**, PR v.2 n.1 p. 420 , 2006.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, sup. 1, p. 41-45, 2004.

MICHALICK, M.S.M. **Gênero Leishmania**. In: NEVES, D. P.; Atheneu (ed) Parasitologia Humana, 10^a edição. São Paulo, cap. 7, p. 31-35, 2002.

MOADDEB, A.; BEHZAD-BEHBAHANI, A. A Simple and Rapid DNA Purification Method for Detection of Leishmania DNA in Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Shiraz E-Medical Journal**, Shiraz, v.9, n 2, 2008.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 583-588, 2000.

MOTAZEDIAN, M.F.; MOHAMMAD, H.; MOTAZEDIAN, G.H.; FATANEH, M.A. urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York , v.60, n.2, p. 151-154, 2008.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p.147-152, 2005.

MORTARINO, M. et al. PCR quantitativa nella diagnosi di Leishmania. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1/2, p. 163-167, 2004.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 366, p.1561-1577, 2005.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, n. 44, p. 364-372, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leishmaniasis: the global trend. Geneva, jan. 2009. Disponível em:
http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html. Acesso em: 25 apr. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível no site:http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html. Acesso em 27 de novembro de 2012.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M. MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 5, p.510-517, 2001.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease, **Nature genetics**, New York, v. 39, p. 839–847,2007.

PENNISI, M. G. et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 29, suppl. 2, p. 301-303, Aug. 2005.

PESSÔA, S. B.; BARRETO, M. P. **Leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Saúde, 1948. 527 p.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum*

chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Basel, 2008.

POCAI, E.A. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro, v.1, p. 713-732, 2005.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, London, v. 122, n. 3, p. 253- 261, 2001.

RABELLO, E. Formes cliniques de la leishmaniose tégumentaire. In: CONGRÈS DES DERMATOLOGISTES ET SYPHILIGRAPHES DE LANGUE FRANÇAISE, 12., 1923, **Strasbourg. [Annales...]. Strasbourg**: [s.n.], 1923.

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

REITHINGER, R.; DUJARDIN, JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 01, p. 21-25, 2007.

REY, L. Leishmania e Leishmaníases: Os Parasitos. In: _____. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro, p.214-226, 2001.

ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; ELÓI-SANTOS, S. M.; CARVALHO, A. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARQUES, M. J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINSFILHO, O. A. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro , v. 35, n.6, p.551-562, 2002.

SALAM, M.A.; MONDAL, D.; KABIR, M.; HAQUE, R. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of kala-azar in an endemic zone of Bangladesh. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, Saddar Karachi, v.25, p. 4635 – 640. 2009.

SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, T.M.A.F.; COSTA, J.M.L. Envolvimento da função renal em pacientes com Leishmaniose Visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 217-221, 2003.

SANTOS, D.O. *et al.* Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2008.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-

REAL, S.; PINHO, R.T., RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, v.103, p. 1-10, 2008.

SERIDI, N.; BELKAID, M.; QUISPE-TINTAYA, W.; ZIDANE, C.; DUJARDIN, J. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v.102, p.556—563, 2008.

SCHÖNAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCCHA, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBERA, W.; JAFFEB, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.47, p.349–358, 2003.

SHAW, J; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de Leishmania. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 733-737, 2005.

SHAW, J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 331-344, 2006.

SILVA, E.S., GONTIJO, C.M., PIRMEZ, C., FERNADES, O., BRAZIL, R.P. Short report: Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, p.896-898, 2001.

SILVA, E. S.; ROSCOE, E. H.; ARRUDA, L.Q.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p. 111-116, 2001.

SILVA, M.B.B.; STEWART, J.M.; COSTA, C.H.N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine**, Baltimore, 2005.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; BRANDÃO-FILHO, S.; MELO, F. L.; MEDEIROS, Z. Alvos Moleculares usados em PCR para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 8, p. 01 – 15, 2010.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.

SOBRINO, R., FERROGLIO, E., OLEAGA, A., ROMANO, A., MILLAN, J., REVILLA, M., ARNAL, M.C., TRISCIUOGLIO, A., GORTÁZAR, C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 198–203, 2008.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 951-958, 2002.

STRAUSS-AYALI, D., JAFFE, C.L., BURSHTAIN, O., GOMEN, L., BANETH, G., Polimerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of leishmania infantum DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.189, p.1779-1833, 2004.

STARK, D.; PETT, S.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum* in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44 (3), p.1178–1180. 2006.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 742 p, 2010.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. Trypanosoma cruzi: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental Parasitology**, New York, v. 114(4), p.279-288, 2006.

ULIANA, S.R.; AFFONSO, M.H.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER, L.M. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, New York, v.72 ,p.157-63. 1991.

VEDOVELLO FILHO, D. et al. American coetaneous leishmaniosis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Paraná state, Brazil. **Zoo. Pub. Health.** V. 55. N. 3, 149-155p. 2008

VIANNA, G. Com. à sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Bol. Soc. Brasil. Dermat.**, [S. l.], v. 1, p. 36-38, 1912.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife.

5.2 Objetivos Específicos

- a) Otimização do sistema de PCR Its-RFLP;
- b) Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP;
- c) Comparação do resultado da PCR-RFLP com o exame direto.

6 ARTIGO CIENTIFICO



A ser submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, fator de impacto 2.058.

Identificação de *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco

Rafael Acioli Medeiros^I, Hévila Sandes^{II}, Glaucia^{II}, Marilia^{II}, Leucio Alves^{II}, Luiz bezerrade Carvalho Junior^{III}, Fabio Lopes de Melo^I

I - Departamento de Parasitologia, Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE - Brasil | CEP: 50.670-420 - Telefones: 81 2101.2500 | 2101.2695. Email: rafacioli@hotmail.com

II – Universidade Federal Rural de Pernambuco

III – Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami

Resumo

Na leishmaniose tegumentar não são recomendadas ações objetivando o controle dos animais domésticos com a doença, tendo em vista o caráter de hospedeiro accidental desses animais, sendo recomendado eutanásia dos cães infectados doentes quando ocorrer agravamento clínico do mesmo (BRASIL, 2007). E o encontro de co-infecção natural entre *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum chagasi* em cão residente em área endêmica (MADEIRA et al.,2003) reforça a importância de métodos diagnósticos que diferenciem as espécies envolvidas na infecção canina e humana. Em virtude dessa necessidade este trabalho tem como objetivo a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. Foram utilizados cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos, domiciliados, provenientes da região metropolitana do recife, estado de Pernambuco – Brasil, com suspeita clínica de leishmaniose atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, totalizando 40 cães. Foram coletados 5ml de sangue total e 200 microlitros de medula óssea para realização do exame direto de medula e da ITS1-PCR. 20 cães foram positivos para ambas as técnicas e 3 foram positivos apenas para ITS1-PCR, tanto em sangue quanto em medula, todas as amostras positivas apresentaram DNA de *Leishmania infantum chagasi*

Palavras-chave: Leishmaniose canina, PCR-RFLP; Diagnóstico

APOIO FINANCEIRO

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os animais que participaram da pesquisa foram avaliados pela médica veterinária responsável pelo projeto. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, recebendo parecer favorável (CEUA 010/2011).

INTRODUÇÃO

As leishmanioses, doenças endêmicas registradas em países do Velho Mundo e do Novo Mundo, são doenças infecciosas que acometem humanos e outros vertebrados, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por dípteros da subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* sp. e *Lutzomyia* sp.). Tais doenças são importantes pelo impacto que produzem na saúde pública e nas implicações econômicas que geram, apresentando alta incidência, letalidade, constituindo em sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho (BORASCHI; NUNES, 2007), sendo consideradas doenças negligenciadas e em expansão no Brasil.

, O cão adquiriu grande importância como reservatório da leishmaniose visceral, no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem, elevada ocorrência de infecções inaparentes e intenso parasitismo cutâneo, representando uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem. Na forma cutânea a importância do cão como reservatório ainda não está completamente elucidada, sendo considerado atualmente hospedeiro accidental, mantendo o vetor no ambiente e consequentemente o ciclo de transmissão.

Tendo em vista que na leishmaniose tegumentar não são recomendadas ações objetivando o controle dos animais domésticos com a doença, tendo em vista o caráter de hospedeiro accidental desses animais, sendo recomendado eutanásia dos cães infectados doentes quando ocorrer agravamento clínico do mesmo (BRASIL, 2007). E o encontro de co-infecção natural entre *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum chagasi* em cão residente em área endêmica (MADEIRA et al., 2003) reforça a importância de métodos diagnósticos que diferenciem as espécies envolvidas na infecção canina e humana.

Em virtude dessa necessidade este trabalho tem como objetivo a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* através da PCR-RFLP em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco.

METODOLOGIA

Amostragem

Foram utilizados cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos, domiciliados, provenientes da região metropolitana do recife, estado de Pernambuco – Brasil, com suspeita clínica de leishmaniose atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, totalizando 40 cães. Cada animal foi registrado em formulário individual, o qual contemplou informações como nome, idade, sexo, endereço e dados clínicos. O exame físico constou principalmente da inspeção da pele e fâneros, além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos, onde se observou a existência ou não de sinais sugestivos de LVC ou LT.

Coleta do material

- **Sangue Total**

Após anti-sepsia com algodão embebido em álcool etílico 70% foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue da veia cefálica, com seringa e agulha. O material foi colocada diretamente em tubo de ensaio contendo solução anticoagulante (EDTA) e estocado em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

- **Coleta de Medula Óssea para realização do diagnóstico molecular e parasitológico**

Após o exame clínico, os animais com diagnóstico presuntivo de LVC, foram submetidos à medicação pré-anestésica por meio de aplicação subcutânea de 0,44 mg/kg de atropina, decorridos 15 minutos, a indução e manutenção anestésica ocorreram por meio de aplicação endovenosa de 1 - 2 mg/kg de xilazina 2% associada a 10 - 15 mg/kg de ketamina 10%. Com o animal anestesiado, após antisepsia, foi realizada punção na crista do osso esterno, utilizando-se seringa descartável (20 ml) acoplada a uma agulha 40x12 mm, uma punção de aproximadamente 200 µl de medula óssea. O material obtido foi transferido para tubos plásticos, com anticoagulante (EDTA) e em seguida armazenado à temperatura de - 20 °C. Os esfregaços confeccionados com os materiais obtidos na punção de medula óssea, após secarem, foram corados pelo método de Giemsa e examinados em microscópio óptico com objetiva de imersão.

Diagnóstico molecular

- **Extração e Purificação do DNA obtido de Cultura de *Leishmania Infantum* e *Leishmania (Viannia) Braziliensis***

O DNA de *Leishmania infantum* foi extraído utilizando o kit de extração “illustraTM tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Adicionar 200 µl de tampão de lise 1 e 10 µl de proteinase K, colocando em seguida na estufa por 1 hora. Depois do tempo, é realizado um spin, adicionando posteriormente solução de lise 2 e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 10 seg por 11.000rpm, passar para coluna do Kit o conteúdo do eppendorf, em seguida realizando outra centrifugação de 1min a 11.000 g e desprezar o sobrenadante. Adicionar 500 µl solução de lise 2 e realizar a mesma centrifugação, novamente. Adicionar 500 µl de solução de lavagem e centrifugar por 3 minutos a 11000 g, desprezando o tubo de coleta em seguida. Transfere-se a coluna para um novo eppendorf, adicionando posteriormente 200 µl de solução de eluição (pré-aquecido a 70 C), e incubar por 1 min em temperatura ambiente. Centrifugar a 1 min por 11000g, descartando a coluna e armazenando o DNA a – 20°C, para posterior dosagem.

- **Análise e quantificação do DNA total**

As amostras de DNA extraídas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM) e corados com brometo de etídio e/ou blue green, com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra. A quantificação do DNA foi realizada através de espectrofotômetro, utilizando o aparelho Ultrospec 3000 UV/Visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech.

- **Extração de DNA das Amostras de Sangue e Medula Óssea**

A extração e purificação de DNA foi realizada com o kit comercial “illustraTM blood & cells genomicPrep Mini Spin Kit” e “illustraTM tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Adicionou-se 200 µl de tampão de lise 1 e 10 µl de proteinase K, colocando em seguida na estufa por 1 hora. Depois do tempo, foi realizado um spin, adicionando posteriormente solução de lise 2 e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10 seg por 11.000rpm, passou-se para coluna do Kit o conteúdo do eppendorf, em seguida realizando outra centrifugação de 1min a 11.000 g e desprezando o sobrenadante posteriormente. Adicionou-se 500 µl solução de lise 2 e realizar a

mesma centrifugação, novamente. Adicionou-se 500 μ l de solução de lavagem e centrifugar por 3 minutos a 11000 g, desprezando o tubo de coleta em seguida. Transferiu-se a coluna para um novo eppendorf, adicionando posteriormente 200 μ l de solução de eluição (pré-aquecido a 70 °C), e incubou-se por 1 min em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 1 min por 11000g, descartando a coluna e armazenando o DNA a – 20°C, para posterior dosagem.

- **Padronização da PCR**

ITS-PCR utilizou os iniciadores LITSR (5'CTGGATCATTTCGATG 3') e L5.8s (5'AAGTGCATAAGTGGTA 3') (produzindo amplicons de 300 – 350 pb dependendo da espécie de *Leishmania*) com o sistema TopTaq Master KIT (QiAGEN) em um protocolo de 34 ciclos (desnaturação, 95 °C por 40 s, anelamento a 53 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 1 min). A ciclagem era precedida por uma etapa de desnaturação a 95 °C por 3 min e 20 s, havendo uma extensão a 72 °C de 6 min ao final. Para essa PCR foram testados as seguintes proporções de primers: 25 e 50 pmols, para os primers LITSR e L5.8s.

- **Avaliação do limite de detecção da PCR**

Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) da técnica foi construída uma curva de diluição a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *Leishmania infantum*, com a finalidade de avaliar a concentração mínima de DNA que o sistema estudado consegue amplificar. Foram efetuadas diluições seriadas de fator 10 nas seguintes concentrações: 0,5 ng/ μ l, 50 pg/ μ l, 5 pg/ μ l, 0,5 pg/ μ l, 50 fg/ μ l, 5 fg/ μ l, 0,5 fg/ μ l, 0,05 fg/ μ l e 0,005 fg/ μ l. Dois μ l de cada diluição foram adicionados nas reações.

- **Avaliação da especificidade da PCR**

A especificidade dos primers foi confirmada experimentalmente através de amplificações utilizando 1 ng de DNA genômico purificado de *Trypanossoma cruzi*, *Wuchereria bancrofti*, *Schistossoma mansoni*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *Canis lupus familiaris*, através da técnica de PCR.

- **Padronização da RFLP**

Foram testados a digestão a partir de 10, 15 e 20 μ l do produto da PCR, utilizando 2,5 μ l de tampão 10x; 2,5 μ l de H₂O; 1 μ l de HaeIII da invitrogen (10 U/ μ l) por 2h a 37°C e por 1h a 37°C.

- **Análise molecular e registro dos resultados**

Dez microlitros dos produtos das PCR convencional foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0 % com coloração pelo Blue Green de acordo com metodologia padronizada. As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4 + SystemTM (Sigma, St. Louis, MA, USA). Consideraram-se positivas as amostras que amplificaram fragmentos com pesos moleculares 300 - 350 pares de base.

Os fragmentos da restrição foram submetidos a eletroforese em gel agarose 3% a 100V em 1,0 x tampão TAE e visualizado em UV após coloração por 15 min em brometo de etídio (0,5 µg/ml).

RESULTADOS

Padronização da PCR

Para a ITS-PCR foram testados as concentrações de 5, 25 e 50 pmols dos primers LITSR e L5.8s com o TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN). Utilizando 5 pmols de cada primer não houve amplificação. Já com as outras duas concentrações testadas, a melhor sensibilidade foi obtida com 50 pmol de cada iniciador, amplificando até 100 fg de DNA de *L. infantum* e *L. braziliensis*, o equivalente a 1/3 parasito por tubo (Figura 1).

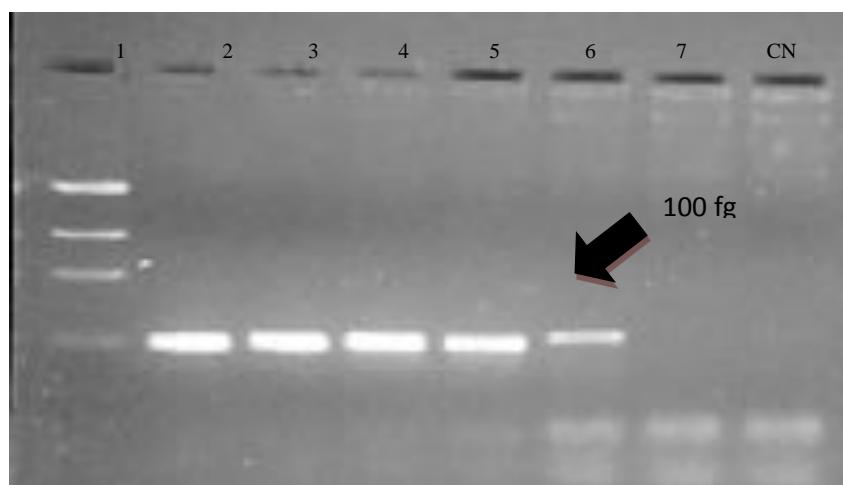


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da otimização da proporção de iniciadores na ITS-PCR. Usando DNA de *L. infantum* 2 (1ng) a 7 (10 fg), alem de um controle negativo (8), utilizando 50 pmol dos iniciadores LITSR e L5.8s. A seta indica o tamanho dos amplicons com 350 pb. 1 – Peso molecular (Low DNA Ladder, INVITROGEN), 2 – 1 ng de DNA genômico de *L. infantum*,

3 – 100 pg de DNA genômico de *L. infantum*, 4 – 10 pg de DNA genômico de *L. infantum*, 5 – 1 pg de DNA genômico de *L. infantum*, 6 - 100 fg de DNA genômico de *L. infantum*, 7 – 10 fg de DNA genômico de *L. infantum*, CN -Controle negativo. A seta indica o limite de detecção de 100 fg de DNA genômico de *L. infantum*

Avaliação experimental da especificidade do sistema de PCR

A análise dos produtos da PCR utilizando DNA genômico de *Schistosoma mansoni*, *Canis lupus familiaris*, *Wuchereria bancrofti*, *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, mostrou que os iniciadores internos LITSR e 5.8s (figura 8a) e externos r221 e r332 (figura 8b) exibiram especificidade satisfatória – tanto em relação a PCR simples como a PCR Nested – só amplificando de forma eficiente e específica o DNA genômico de *L. infantum* e *L. braziliensis* (Figura 2).

Como previsto pelas análises teóricas dos alinhamentos múltiplos de seqüências, as abordagens de PCR desenvolvidas não amplificaram DNA de espécies que são hospedeiros vertebrados (*H. sapiens*) de *Leishmania*.

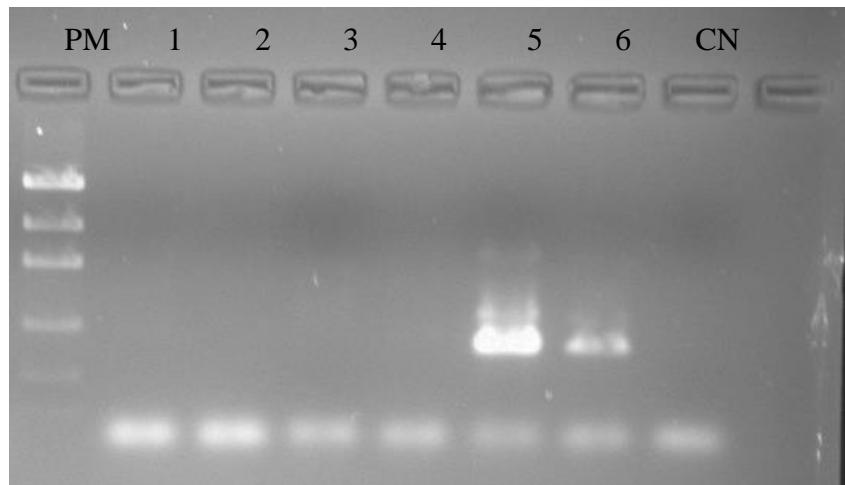


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 2% para a avaliação da especificidade da Nested-PCR.
 PM – Peso Molecular (Low Mass Ladder – INVITROGEN), faixa 1 – 1 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, faixa 2 – 1 ng de DNA genômico de *S. mansoni*, faixa 3 – 1 ng de DNA genômico de *W. bancrofti*, faixa 4 – 1 ng de DNA genômico de *Canis lupus familiaris*, faixa 5 – 1 ng de DNA genômico de *L. infantum*, faixa 6 – 1 ng de DNA genômico de *L. braziliensis* e CN – Controle Negativo.

Padronização da RFLP

Após a realização da PCR foram testados a digestão a partir de 10, 15 e 20 µl do produto da PCR, utilizando 2,5 µl de tampão 10x; 2,5 µl de H₂O; 1 µl de HaeIII (10 U/µl) por 2h a 37°C e por 1h a 37°C sendo que o melhor resultado foi obtido utilizando 15 µl do produto da PCR por 2h de restrição (Figura 3).

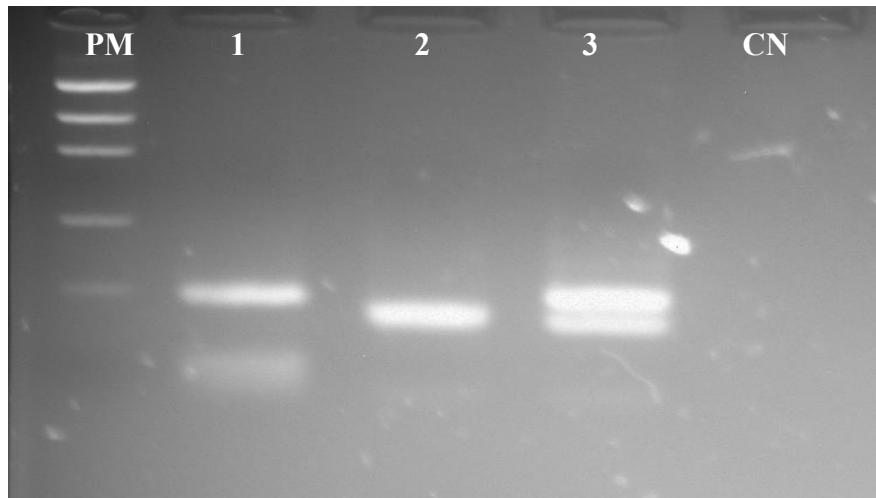


Figura 3: PCR RFLP utilizando os produtos da ITS1-PCR e digestão com a enzima HAEIII. 1 - *L. infantum*; 2 - *L. braziliensis*; 3 – *L. major* e CN – controle negativo .

Resultado dos demais testes diagnósticos

- **Resultado do Exame Direto de Medula óssea**

Entre os 40 cães com suspeita clínica de leishmaniose enviados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco 20 (50%) foram positivos para o exame direto de medula óssea, onde foi possível visualizar as formas amastigotas

Resultado de Exame Molecular

- **PCR em amostras de medula óssea e sangue total**

Entre os 40 cães com suspeita clínica de leishmaniose enviados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco 23(57,5%) tanto em amostras de sangue total como em amostras de medula óssea. Os resultados da PCR foram repetidos 4 vezes

A PCR apresentou uma sensibilidade igual a 100% e uma especificidade de 85%, com valor preditivo positivo de 87% e valor preditivo negativo de 100%, a prevalência para a PCR foi de 57,5% com um índice de confiabilidade de 95%.

- **Resultado da PCR-RFLP nas amostras biológicas**

Foi possível identificar as 23 amostras que foram amplificadas pela ITS1-PCR e todas elas foram da espécie *Leishmania infantum chagasi* (Figura 4), portanto se tratavam todos de casos de leishmaniose visceral.

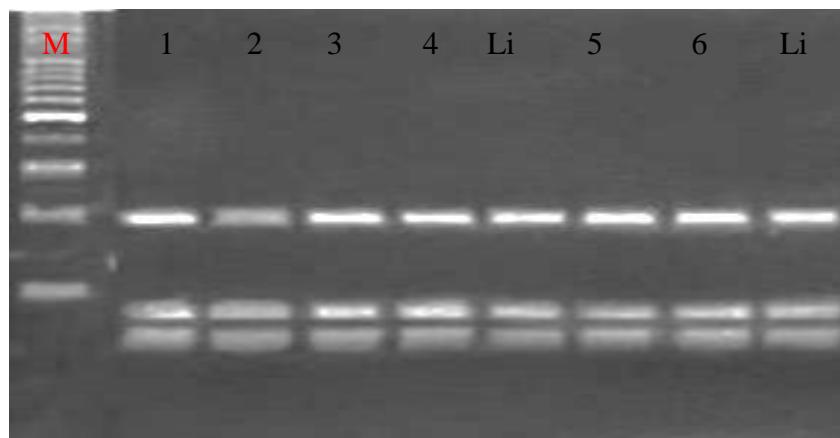


Figura 4: Resultado da PCR-RFLP. M-DNA mass Ladder 100pb; 1,2,3,4,5,6 – Amostras de cães; Li-DNA genômico de *Leishmania infantum chagasi*.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o padrão de referência para o diagnóstico de Leishmaniose foi à visualização do parasita por meio de microscopia óptica (MO) ou de uma cultura de nódulo linfático, baço ou aspirados de medula óssea (ANDRADE et al., 2006). Contudo, a sensibilidade dessas técnicas tanto em humanos quanto em cães é variável e relativamente baixa (OSMAN et al., 1997, REALE et al., 1999).

Nos últimos anos, a PCR tem sido usada como uma técnica sensível e específica para a detecção de DNA de *Leishmania* em diversas amostras biológicas (IKONOMOPOULOS et al., 2003; VOLPINI et al., 2004). No presente estudo, a ITS1-PCR desenvolvida foi capaz de detectar 100 fg DNA/μl, o que seria menos que um parasita, uma vez que é conhecido que um parasita contém aproximadamente 300 fg de DNA (VERGEL; WALKER; SARAVIA, 2005), o ensaio de PCR efetuado sob as condições aqui apresentadas permitiria a detecção de DNA representando 1/3 de um parasita.

Em estudos anteriores, a ITS1-PCR foi capaz de detectar de 10 a 0,2 parasitos por tubo (MARFURT et al., 2003; SCHONIAN et al., 2003), nossa otimização vem a corroborar com esses achados, já que apresentou resultados similares.

Para evitar problemas de reação cruzada que são comuns em testes sorológicos, o resultado da ITS1-PCR frente a outras espécies mostrou a amplificação específica do gênero *leishmania* sp. corroborando com os dados encontrados por Schonian e

colaboradores ,em 2003 ,que visualizaram a amplificação do DNA de *L. infantum* e *L. braziliensis* ao utilizar o sistema de NESTED-PCR que inclui a ITS1-PCR, além de outras espécies do gênero Leishmania.

Entre os 40 cães com suspeita clínica de leishmaniose analisados 20 (50%) foram positivos para o exame direto de medula, já a ITS1-PCR além de amplificar o DNA de *leishmania sp.*, nestas mesmas 20 amostras amplificou mais 3, totalizando 23 (57,5%) amostras positivas. Os 3 cães que foram positivos apenas para PCR serão acompanhados e haverá realização de pesquisa do parasito em períodos de 3 meses durante 1 ano. O fato de todas as amostras positivas para o exame direto serem também positivas para PCR corrobora com o estudo de Azevedo e colaboradores (2011) que observaram a mesma coisa em um estudo sobre Leishmaniose canina em Goiânia, Goiás.

Tendo ciência do pequeno número de amostras que foi possível coletar (n=40), nossos resultados são bastante animadores. A sensibilidade de 100% da ITS1-PCR no presente estudo é superior a de 94% citada pelo MS, 2006, a ITS1-PCR desenvolvida no presente estudo mostrou um elevado valor preditivo positivo, mostrando sua capacidade de identificar indivíduos realmente infectados e um capacidade de 100% para identificar indivíduos sadios, o que torna este teste bastante promissor, acrescentando a isso um índice kappa de 0,85 o que confere a ITS1-PCR uma alta correspondência com o teste parasitológico. Tendo em vista que o resultado da PCR utilizando amostras de sangue total e medula óssea no presente estudo apresentaram o mesmo resultado, esta PCR possibilita a utilização de amostras de sangue que são obtidas de forma menos invasiva que a punção de medula óssea e a possibilidade de utilização dos produtos da ITS1-PCR para diferenciação das espécies de *Leishmania sp.* (SILVA et al., 2010). Além da necessidade de profissionais bem treinados para a realização da punção de medula óssea e do diagnóstico depender da habilidade do profissional que irá realizá-lo.

Diversas formas de PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico da Leishmaniose com diversas finalidades, porém para vigilância epidemiológica, é necessário não só a detecção de parasitas, mas também a identificação de espécies, particularmente em áreas endêmicas com ocorrência simultânea de formas visceral e cutânea da doença (QUARESMA et al., 2009).

Schonian e colaboradores em 2003 já tinham demonstrado a capacidade de diferenciação de diversas espécies do gênero *leishmania sp.* utilizando a região ITS1 para tal, sendo assim, o resultado obtido com a restrição padronizada nesse estudo

corrobora com os dados obtidos por Schonian e colaboradores (2003) o qual serviu como parâmetro para realização do presente estudo. Diversos estudos utilizaram a PCR-RFLP para caracterização da leishmaniose em determinada área (ANDRADE et al, 2006; ALMEIDA, 2012). Além disso, a aplicação da PCR-RFLP requer apenas pequenas quantidades de DNA e permite a diferenciação entre espécies do novo mundo (ANDRADE et al., 2006) e demonstrou ser um método prático, seguro e rápido para a identificação de espécies de parasitas em animais infectados com CVL (QUARESMA et al.,2009).

No presente estudo a PCR-RFLP teve um ótimo desempenho, pois de todas as amostras amplificadas foi possível à identificação da espécie, essa identificação é de fundamental importância para estudos epidemiológicos e para o controle da Leishmaniose (QUARESMA et al., 2009), por exemplo, no Brasil a eutanásia de cães soropositivos é método de controle utilizado, embora a espécie infectante de Leishmania não seja revelada pelos métodos sorológicos utilizados. O uso de PCR-RFLP evitaria a morte desnecessária de cães com infecção por *L. braziliensis*.

Com a restrição pela HAEIII, foi possível identificar que todos os cães no atual estudo em que foi detectado o DNA de *Leishmania sp.* através da ITS1-PCR, apresentavam como agente etiológico a *Leishmania infantum chagasi*, sendo portanto, todos casos de Leishmaniose visceral canina que confirma com estudos de Dantas-Torres, 2006 e colaboradores que aponta que apesar do predomínio de casos CVL estarem no sertão e agreste a região metropolitana de recife apresenta um numero de casos consideráveis, especialmente o município de Itamaracá apresentando o segundo maior numero de notificações do estado de Pernambuco no período de 1990 a 2001.

Dantas-torres, 2006 em sua dissertação também mostrou uma prevalência 40,3% dos cães de anticorpos anti-*Leishmania* sp. de 40,3%, a taxa mais alta já relatada em Pernambuco.

REFERENCIAS

ALMEIDA , A.B.P.F. et al. Characterization of canine Leishmaniose by PCR –RFLP in Cuiba , Mato Grosso ,Brazil. **Archives of Veterinary Science** , Curitiba , v. 17 (2) , p. 68-72 , 2012.

ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; 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**, Amsterdam, v. 140, p. 231–238, 2006.

AZEVEDO E.M.R et. al. Estudo da leishmaniose visceral canina no município de goiânia, Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v.40 (2), p.159-168, 2011.

BRASIL.Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 184 p. , 2007.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, n.71, p. 44-48, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

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

MADEIRA, M.F., UCHÔA, C.M.A., LEAL, C.A., SILVA, R.M.M., DUARTE, R., MAGALHÃES, C.M., SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.30, p.551-555, 2003.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N.D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v.46, p.115–124, 2003.

OSMAN, O.F., OSKAM, L., ZIJLSTRA, E.E., KROON, N.C.M., SCHOONE, G.J., KHALIL, E.A.G., EL-HASSAN, A.M., KAGER, P.A. Evaluation of PCR for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, Washington,v.35, p.2454-2457, 1997.

QUARESMA, P.F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica, Basel**, v.111, p.289–294, 2009.

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

SCHÖNAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCHE, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBERA, W.; JAFFEB, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.47, p.349–358, 2003.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; BRANDÃO-FILHO, S.; MELO, F. L.; MEDEIROS, Z. Alvos Moleculares usados em PCR para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 8, p. 01 – 15, 2010.

VERGEL, C., WALKER, J., SARAVIA, N.G. Amplification of human DNA by primers targeted to Leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Washigton, v.72, p.423–429, 2005.

VOLPINI, A.C., PASSOS, V.M., OLIVEIRA, G.C., ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica, Basel**, v.90, p.31-37, 2004.

7 CONCLUSÕES

- a) O sistema otimizado neste estudo, pode ser bastante promissor no diagnóstico da *Leishmania sp*. Por se tratar de um teste de fácil execução e de custo consideravelmente baixo.
- b) Outro ponto importante que podemos levantar é a possibilidade da ITS1-PCR de diferenciar espécies de *Leishmania sp* em regiões onde este gênero apresente diversidade de espécies endêmicas.
- c) Há necessidade de um estudo mais amplo com a intensão de validar o sistema desenvolvido para que possa juntamente com outros métodos diagnósticos para *Leishmania* viabilizar um diagnóstico mais preciso e menos invasivo.