

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas
e da PCR para a detecção de *Leishmania spp.***

Alberto Wagner Delmondes Cabral
Mestrando

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Orientador

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP
para obtenção do título de Mestre no
Programa de PG em Biologia Geral e
Aplicada.**

BOTUCATU - SP

2007

ALBERTO WAGNER DELMONDES CABRAL

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O DIAGNÓSTICO POR
TÉCNICAS SOROLÓGICAS E DA PCR PARA A
DETECÇÃO DE *LEISHMANIA spp.***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Ciências Biológicas, Área de Concentração
Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências
de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins

Ribolla

BOTUCATU – SP

- 2006 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Cabral, Alberto Wagner Delmondes.

Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania spp.* / Alberto Wagner Delmondes Cabral. – Botucatu: [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Assunto CAPES: 20200005

1. Reação em cadeia pela polimerase 2. Leishmaniose -

Diagnóstico

3s. Leishmania

CDD 616.9364

Palavras-chave: Cinetoplasto; Diagnóstico; ELISA; *Leishmania*; PCR; RIFI

“Tenha menos medo, tenha mais esperança; coma menos, mastigue mais; lamente-se menos, respire mais; converse menos, diga mais; odeie menos, ame mais; e todas as boas coisas são suas.”

Provérbio sueco

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado, nos momentos de alegria ou de tristeza. A família que se esforçou para que eu tivesse a melhor educação possível e sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e pelas oportunidades que me apresentou no decorrer da mesma.

A minha família querida pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

A minha namorada Rosabel pelo apoio, companheirismo, carinho, preocupação e compreensão em todas as horas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Ribolla por acreditar na minha capacidade, pela oportunidade de aprendizado e pela amizade.

Ao professor Dr. Helio Langoni e orientadas, Marcella Zampoli Troncarelli e Janaina Biotto Camargo do departamento de Higiene Veterinária, pela colaboração no projeto, com a realização da RIFI e envio de amostras.

A professora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima e orientada, Juliana Giantomassi Machado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba, pela colaboração no projeto, com a realização do teste de ELISA e envio de amostras.

Aos amigos do laboratório, Jayme, Diego, Bianca, Aline, Karina, Letícia, Letícia Gushi, Élen, Fábio, Soneca pela amizade sincera, pelos momentos de aprendizado e de descontração e por proporcionarem um ambiente agradável para trabalhar.

Aos amigos do departamento, Adriano, Karina, Gustavo, Marco, Nelson, Bruna, Giane, Viviane, Aruac, Erica, Satie, Carol, pela amizade e momentos de descontração.

Aos professores do departamento, Dra. Lucia, Dra. Tereza, Dra. Semiramis, Dra. Mônica, Dra. Luciene, Dr. Reinaldo, Dr. Alessandro, Dr. Newton e Dr. Wesley pela amizade e por todo exemplo de profissionalismo e competência.

Aos funcionários do departamento, Nilza, Roberto, Márcia, Valdir e Salete, pela amizade e por toda ajuda e colaboração.

Aos amigos e professores de outros departamentos.

E finalmente a todos que de alguma forma contribuíram para esta dissertação e que não estão aqui citados.

INDICE	PÁGINAS
I) INTRODUÇÃO	16
II) OBJETIVOS	19
III) MATERIAIS E MÉTODOS	20
III.1. PARASITAS	20
III.2. AMOSTRAS CLINICAS	20
III.3. EXTRAÇÃO DE DNA	21
III.4. AVALIAÇÃO DA PCR	21
III.5. ENSAIO DE PCR	21
III.6. PCR EM TEMPO REAL	22
IV. RESULTADO	23
V. DISCUSSÃO	27
V.1. ENSAIO DE PCR	27

V.2. AMOSTRAS CLÍNICAS	28
VI. CONCLUSÕES	29
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO & ABSTRACT

RESUMO

A leishmaniose é um importante problema de saúde pública, compreendendo doenças zoonóticas causadas por membros do gênero *Leishmania*, largamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Diversos métodos já são utilizados de rotina para o diagnóstico dessa doença, entre eles o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o exame direto ao microscópio. Como nenhuma destas técnicas permite um diagnóstico sensível, rápido e definitivo, diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram desenvolvidos. Recentemente, vários grupos têm mostrado que a PCR é um método sensível e específico para a detecção do DNA da *Leishmania* em uma variedade de amostras de humanos, cães e outros animais. Neste estudo, nós avaliamos um método de detecção de DNA de *Leishmania* de material clínico de uma forma que poderia ser aplicável para uso em rotina. O ensaio proposto consiste na amplificação de uma região do minicírculo do cinetoplasto de DNA de *Leishmania spp.*. Nossa avaliação foi completada com a comparação dos resultados produzidos pelo ensaio de PCR proposto com o ELISA e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), nas amostras clínicas coletadas de cães suspeitos de leishmaniose. Das 162 amostras coletadas, 85 amostras são provenientes de Bauru-SP, 73 de Araçatuba-SP e 4 de Piracicaba-SP. Nas amostras de Bauru e Piracicaba foram realizados testes de RIFI e PCR, enquanto que nas amostras de Araçatuba foram feitos testes de ELISA e PCR. A comparação dos resultados obtidos pela sorologia e pela técnica de PCR mostrou 87% de concordância, com 141 dos 162 casos produzindo resultados idênticos tanto pela PCR quanto pela sorologia. A concordância entre os resultados positivos e negativos produzidos por cada método foi de 88,7% (110/124) e 52,8% (19/36), respectivamente. Estes resultados indicam alta discrepância entre a PCR e a sorologia para os casos negativos. Isso pode acontecer devido a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasita circulante no sangue no momento da coleta e consequentemente não detectado pela PCR, inibidores da PCR presentes no sangue ou

ainda devido a reações cruzadas da sorologia com outras doenças. A amplificação concomitante de outros genes de *Leishmania* poderia aumentar a sua especificidade e principalmente a sensibilidade e com isso poderíamos assegurar a sua eficácia para o diagnóstico da leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*, diagnóstico, cinetoplasto, PCR, ELISA, RIFI

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important public health problem, comprising zoonotic diseases caused by members of the genus *Leishmania*, widely distributed in tropical and subtropical regions throughout the world. Many methods are routinely used in the diagnostic of this disease, among them the enzyme immunoassay (ELISA), indirect fluorescent antibody technique (IFAT), and direct microscopy examination. As any of these techniques allows a sensible, rapid and precise diagnostic, molecular diagnostics based at the PCR were developed. Recently, many groups have showed that the PCR is a specific and sensible method for detection of DNA of *Leishmania* in a variety of samples from human, dogs and other animals. In the present study, we have evaluated a detection of *Leishmania* DNA from clinical material in a manner that could be applicable even for routine use. The proposed assay consists of a pair of primers target to the minicircle area of the kinetoplast DNA of *Leishmania* spp.. Our assessment was completed with the comparative evaluation of the results produced by the proposed PCR assay, ELISA and indirect fluorescent antibody technique (IFAT), on clinical samples collected from dogs suspected of leishmaniasis. From the 162 collected samples, 85 samples came from Bauru-SP, 73 from Araçatuba-SP and 4 from Piracicaba-SP. The samples from Bauru and Piracicaba were analyzed by IFAT and PCR, while in the samples proceeding from Araçatuba were realized ELISA and PCR. The comparative results between serology and PCR related 87% of agreement, with 141 of 162 cases producing identical results from both, PCR and serology. The agreement between the positive and negative results produced by each method was 88,7% (110/124) and 52,8% (19/36), respectively. These results indicate high discrepancy between PCR and serology for the negative cases. This can happen due to some factors, as the permanence of circulating antibodies in the peripheral blood even after the elimination of the parasite; the low number of circulating parasite in the blood at the moment of the collection and consequently not detected by the PCR, inhibitors of the PCR in the blood or still due the crossed reactions of the serology with other illnesses. The concomitant amplification of other genes of *Leishmania* could increase

its especificity and mainly sensitivity and with this we could assure its effectiveness for the diagnosis of leishmaniasis.

Key -Words: *Leishmania*, diagnostic, kinetoplast, PCR, ELISA, IFAT.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitidas através da picada de fêmeas de mosquitos da subfamília Phlebotominae. Esse gênero de protozoários pertence à família Trypanosomatidae, a mesma do *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* de acordo com o seu desenvolvimento no intestino do inseto vetor (Marfurt et al, 2003). Especialistas distinguem cerca de 18 espécies de *Leishmania* em função do tipo de lesão que causam e de algumas características imunológicas e moleculares. As formas clínicas das leishmanioses são particularmente variadas, representando um complexo de doenças: leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode ser letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora causando deformidades irreversíveis principalmente na face dos pacientes; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença persistente provocada por uma resposta imune celular deficiente; e leishmaniose cutânea (LC), que provoca o aparecimento de inúmeras ulcerações na pele dos pacientes.

A epidemiologia da leishmaniose é extremamente diversa: 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem, e 30 espécies de flebotomíneos são vetoras. Existem duas classificações epidemiológicas para a doença: zoonose, que inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem é a única fonte de infecção para o mosquito vetor. A doença se acha amplamente distribuída, atingindo um total de 88 países: 72 são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco, com uma incidência global anual de 1-1,5 milhão de casos da forma cutânea e de 500.000 casos da forma visceral (Desjeux, 2004). A última é considerada a mais séria e freqüentemente fatal, especialmente em áreas endêmicas (de Beer et al., 1990; Ferrer, 1999).

I.2 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é normalmente causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*: *L. (L.) donovani* no Velho Mundo e *Leishmania (L.) infantum* ou *L. chagasi* no Velho Mundo e no Novo Mundo, mas ocasionalmente, outra *Leishmania spp.* como a *Leishmania (L.) amazonensis* na América Latina (Barral et al., 1991; Almeida et al., 1996) e *Leishmania (L.) tropica* no Oriente Médio (Hyams et al., 1995) ou África (Mebrahtu et al., 1989) tem sido isoladas de pacientes com manifestações viscerais. O dermatropismo das espécies do complexo *L. donovani* também tem sido observado em infecções humanas causadas pela *L. (L.) infantum* na bacia do Mediterrâneo e no norte da África, *L. (L.) donovani* no Sudão e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo (Bem-Ismael et al., 1992; Frank et al., 1993; Noyes et al., 1997; Belli et al., 1999). A única espécie do complexo *L. donovani* encontrada no Brasil é a *L. (L.) chagasi*, raramente causando manifestações não viscerais (Orsini et al., 2002).

A leishmaniose visceral está entre as seis doenças mais importantes causadas por protozoários no mundo dado a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e emergência em indivíduos portadores da infecção por HIV. Os dados da mortalidade relatados pela Organização Mundial da Saúde registra 57.000 mortes devido à leishmaniose visceral em 1999 e 41.000 em 2000 (WHO, 2000 e 2001), entretanto estes números são apenas estimativos. A Figura 1 mostra a distribuição geográfica da leishmaniose visceral ao redor do mundo. Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo no Brasil aquele em que se registra o maior número de casos (cerca de 90% do total notificado) (Neves, 2005).

Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral

Figura 1. Distribuição global da leishmaniose visceral (WHO, 1990)

I.2.1 Características Epidemiológicas no Brasil

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 hab (Ministério da Saúde, 2006).

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do País.

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde, 2006). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 2.

A prevalência de leishmaniose visceral canina é maior e normalmente precede a doença em humanos. Historicamente, no estado de São Paulo, a leishmaniose visceral americana (LVA) era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do país. Em 1998, a transmissão canina foi registrada pela primeira vez no município de Araçatuba. Posteriormente, em 1999, foi registrado o primeiro caso humano de LVA e, desde então, a doença vem ocorrendo em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista, nos quais a transmissão tem feição exclusivamente urbana (Neves, 2005). A figura 3 ilustra a relação entre os óbitos e número de casos no estado de São Paulo, entre os anos de 1999 e 2006.

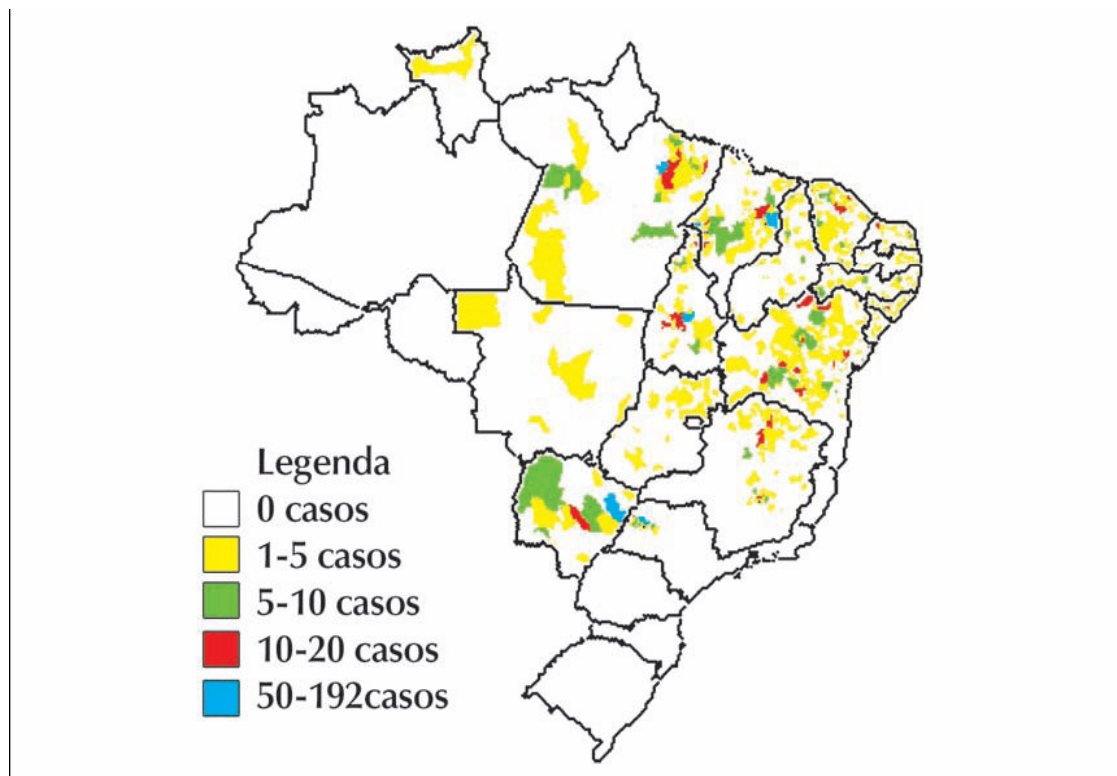


Figura 2. Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município, Brasil 2002.Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS

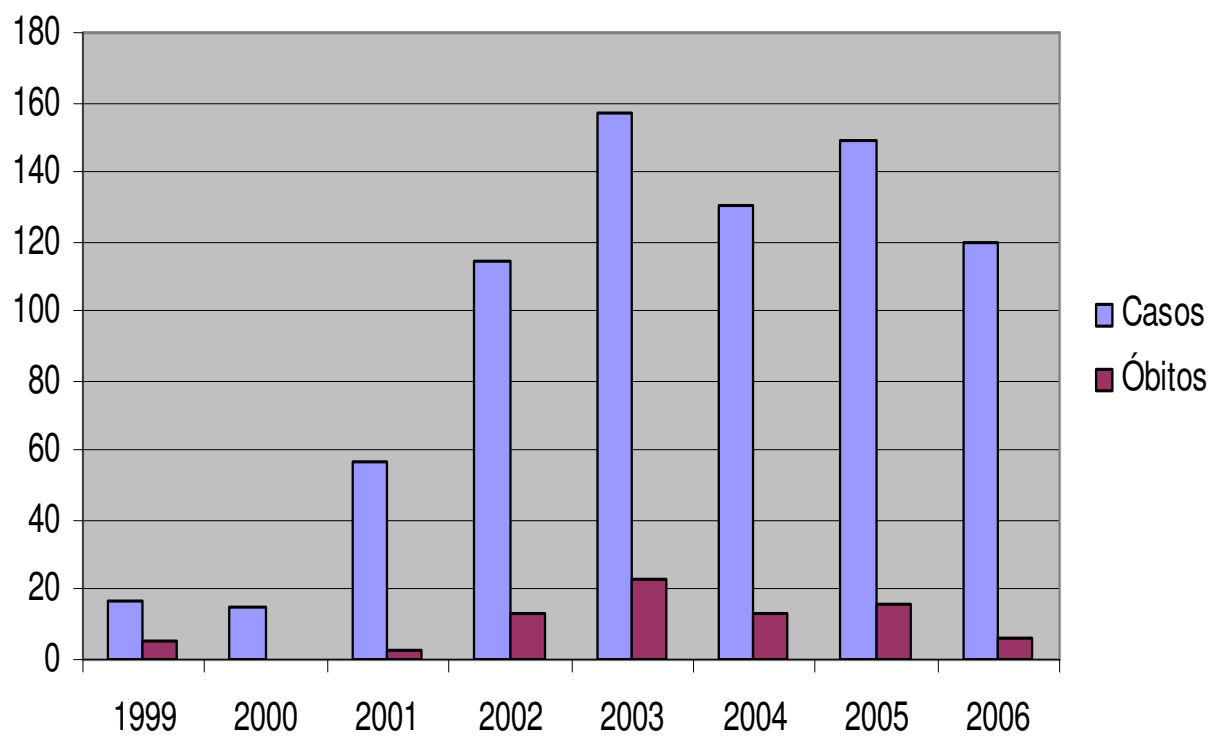


Figura 3) DVA em São Paulo. Casos: 75%, Letalidade: 10,4%. Fonte: CVE, SP. Dados em 08/2006.

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota (Figura 4) nos tecidos dos vertebrados. No Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV (Ministério da Saúde, 2006).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para a *Leishmania chagasi*. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (Ministério da Saúde, 2006).

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste, a *L. longipalpis* era encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação a este ambiente foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos.

Recentemente, ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio.

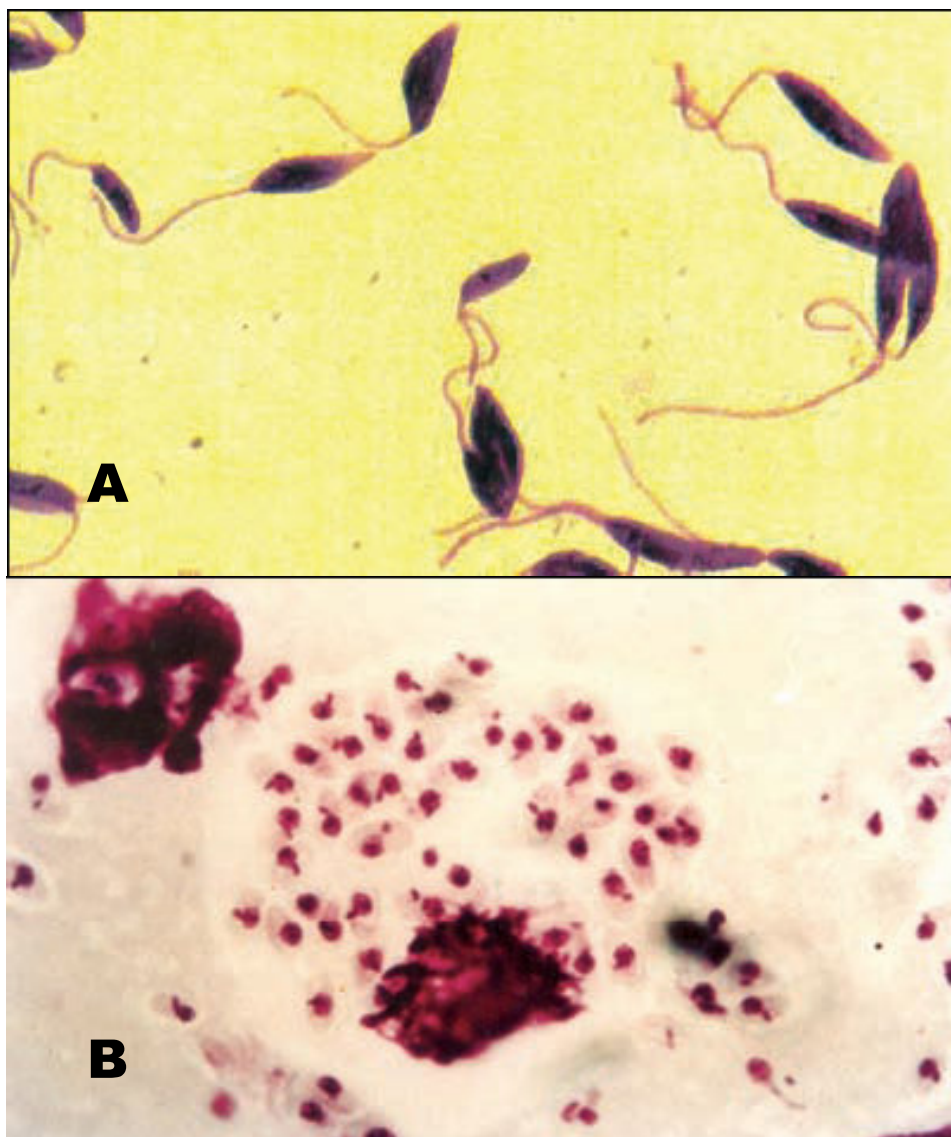


Figura 4. Formas da *Leishmania chagasi*. (A) forma flagelada promastigota. (B) forma aflagelada amastigota. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.

Na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. (Ministério da Saúde, 2006).

O ciclo biológico da *Lutzomyia longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (Figura 5).

Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. (Ministério da Saúde, 2006).

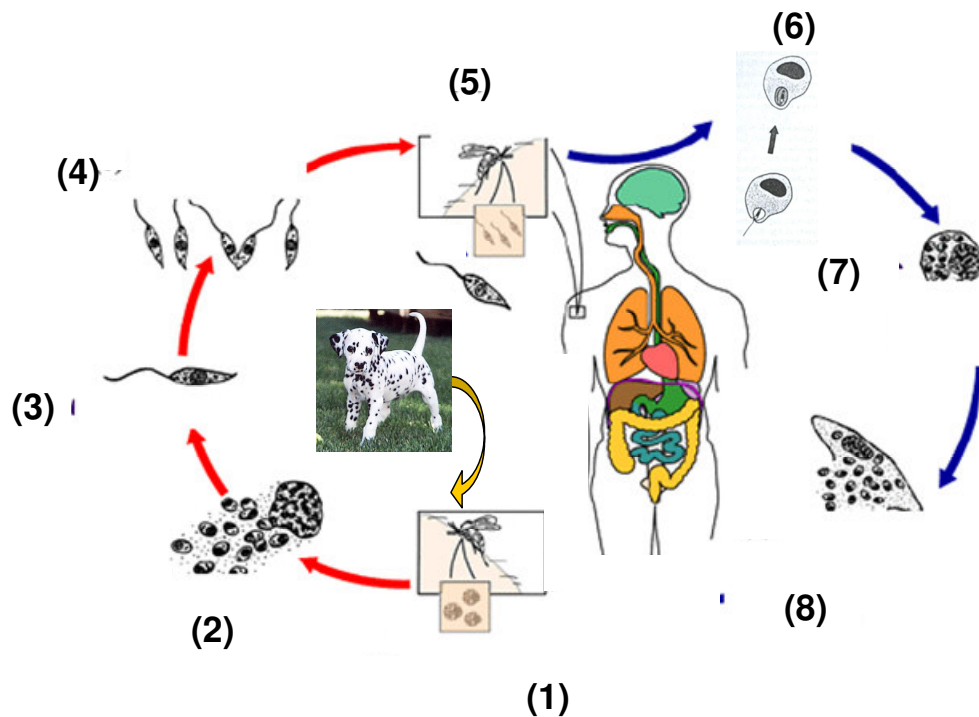


Figura 5. Ciclo da Leishmaniose visceral.

- (1) Mosquito ingere sangue infectado do cão.**
- (2) Ingestão de células parasitadas.**
- (3) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do mosquito.**
- (4) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor.**
- (5) Mosquito retira sangue do hospedeiro e injeta promastigotas.**
- (6) Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos.**
- (7) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos.**
- (8) Amastigotas são liberados e infectam outras células.**

O diagnóstico da leishmaniose visceral é baseado em métodos de detecção direta que oferecem a vantagem da simplicidade, no entanto a necessidade da coleta de aspirados de medula óssea ou de baço faz destas técnicas invasivas potencialmente arriscadas. Além disso, a sensibilidade do exame direto pode ser baixa, variando de 52% a 98% (Disch et al., 2006). A detecção de parasitas pelo exame microscópico é dependente da presença de um grande número de parasitas na amostra. Os parasitas podem ser cultivados do material aspirado para aumentar a sensibilidade, mas isso pode atrasar o tratamento por semanas (Zijlstra et al., 1992; Bryceson, 1996).

Entre as técnicas sorológicas, a reação de imunofluorescência (RIF) (Duxbury and Sadun, 1964), o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (Ho et al., 1983), e o teste de aglutinação direta (El-Harith et al., 1986) são as mais utilizadas. Esses testes usam promastigotas ou proteínas solúveis do parasita como fonte de antígeno, o que pode limitar a especificidade do teste e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas padrões. A sorologia mostra que os animais infectados desenvolvem uma resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida.

Em relação a sorologia, animais saudáveis podem ser soropositivos, e animais infectados ocasionalmente se tornam soronegativos, dificultando o uso destas técnicas. Além disso, como nenhuma destas técnicas permite um diagnóstico rápido e definitivo, diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram desenvolvidos (Berrahal et al., 1996; Reithinger et al., 2000; Leontides et al., 2002; Schonian et al., 2003). Diferentes métodos de extração de DNA (Reithinger et al., 2003; Muller et al., 2003), diferentes genes alvo (Lachaud et al., 2002), diferentes frações de amostras de sangue (sangue total, fração leucocitária ou “buffy coat”) tem sido comparadas (Lachaud et al., 2001).

Mais de uma década após o desenvolvimento do primeiro ensaio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a *Leishmania* (Rodgers et al., 1990), uma experiência considerável com esta técnica para o diagnóstico da leishmaniose visceral tem sido acumulada. O ensaio de PCR para *Leishmania* a fim de amplificar um número diferente de alvos de DNA usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa

não invasiva altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, mostrando sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (Singh et al., 1999; Lachaud et al., 2000; Xiao-Su et al., 2000; Fisa et al., 2002).

Recentemente, vários grupos têm mostrado que a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método sensível e específico para a detecção do DNA da *Leishmania* em uma variedade de amostras de humanos, cães e raposas. Também há alguns anos, vários autores já demonstraram que a PCR pode melhorar a detecção de leishmaniose visceral canina (Ashford et al., 1995; Berrahal et al., 1996; Sanches et al., 2001; Mathis and Deplazes, 1995; Reale et al., 1999; Reithinger et al., 2000; Roura et al., 1999; Gallego et al., 2001; Zerpa et al., 2000).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular simples que provou ser mais específica e sensível do que métodos diagnósticos convencionais (Ashford et al., 1995) e pode ser realizada a partir de qualquer amostra biológica. A seleção dos genes alvo é crítica tanto para a sensibilidade da PCR quanto para a especificidade. Entretanto, enquanto o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos pode ser considerada extremamente eficiente (Costa et al., 1996; Lachaud et al., 2000; Mathis and Deplazes, 1995; Nuzum et al., 1995), o diagnóstico por PCR da leishmaniose visceral canina continua a ser um problema sério, devido, por exemplo, as dificuldades encontradas na preparação do DNA ou a alta frequência de inibidores de PCR em sangue de cães (Lachaud et al., 2002).

Uma forma de aumentar a sensibilidade da PCR é o uso de alvos multicópias, como minicírculos do cinetoplasto (Reale et al., 1999; Singh et al., 1999; Smyth et al., 1992). Utilizando os conhecimentos já obtidos referentes às seqüências de nucleotídeos do DNA genômico do parasita, diferentes pares de oligonucleotídeos vêm sendo propostos e estão sendo testados para o diagnóstico da leishmaniose visceral por meio da PCR com resultados promissores relatados em literatura específica. Estes estudos mostraram que a técnica da PCR é sensível e promissora para o diagnóstico de pacientes infectados com *L. donovani* ou *L. chagasi*.

Os diagnósticos podem ser feitos através de aspirados de medula óssea e de linfonodos (onde foram encontradas maiores concentrações dos parasitas), biópsias de pele

e também através de amostras de sangue periférico (Smyth et al., 1992; Piarroux et al., 1994; Berrahal et al., 1996; Ramos et al., 1996; Aviles et al., 1999; Reale et al., 1999; Aransay et al., 2000; Hu et al., 2000; Lambson et al., 2000; Harris et al., 2000).

No presente estudo, preferimos avaliar um protocolo de PCR já descrito (Aransay et al., 2000) para a detecção de *Leishmania spp.* e utilizar amostras de sangue de cães, provenientes de cidades onde a prevalência da doença é alta.

II. OBJETIVOS

- . Identificar uma ferramenta molecular confiável, para ser usada no diagnóstico de rotina da leishmaniose, alcançando alto nível de reprodutibilidade e confirmação de resultados, de uma maneira simples e rápida.

- . Comparar métodos de diagnóstico para estabelecer a técnica mais eficaz na detecção da *Leishmania chagasi*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Amostras clínicas

Foram coletadas 162 amostras, distribuídas da seguinte forma: 85 de Bauru-SP, 73 de Araçatuba-SP e 4 de Piracicaba-SP. As amostras de sangue foram colocadas em tubos vacutainers (BD) contendo EDTA como anticoagulante. Amostras similares de cães saudáveis provenientes de área não endêmica (Botucatu-SP) foram usadas como controle negativo.

III.2 Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue de cão foi extraído com o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante. Após a extração o DNA foi suspenso em 70µl de tampão TE e armazenado em freezer a -20°C até o momento de uso.

III.3 Ensaio de PCR

Os protocolos de PCR foram testados com preparações de DNA de amostras de sangue de cães saudáveis, como controle negativo e amostras de cultura como controle positivo. As reações foram realizadas em um termociclador T Gradient (Whatman Biometra®). Cada reação de PCR foi composta de 2,5µl de tampão da reação (200mM Tris-HCl pH 8.4, 1,5 mM MgCl₂, 500mM KCl), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq polimerase (GE Healthcare) e 1µM de cada oligonucleotídeo LINR4-LIN19 (Aransay et al., 2000) em um volume total de 25µl. As reações de PCR foram realizadas com 33 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C, e 1min a 72°C, seguido por um passo de extensão de 7min a 72°C. Os produtos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 0,5µg/ml, visualizados em transiluminador e fotografados.

III.4. Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento de 10µL cada, será realizada utilizando-se 2µL de BigDye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech), 2,5µL de DNA (50ng/µL), 2µL de um dos iniciadores (5pmol) e 3,5µL de água ultrapura. A programação utilizada para a reação de sequenciamento incluirá um ciclo de 35 vezes a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos em termociclador (MJ Research modelo PTC100-96V). Uma vez realizada a reação, o DNA amplificado será precipitado utilizando-se 1µL de acetato de sódio/EDTA (kit do BigDye Terminator) e 40µL de isopropanol 95%, deixando-se no escuro por 15 minutos. A mistura será centrifugada por 15 minutos a 12.000g em temperatura ambiente. O sobrenadante será retirado com auxílio de uma pipeta, e o sedimento será lavado com 250µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 12.000g em temperatura ambiente, o sobrenadante será retirado novamente com auxílio de uma pipeta e o DNA precipitado será secado a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Após a secagem das amostras, serão adicionados 3,4µL de tampão de carregamento Loading Dye (kit do BigDye Terminator). As amostras serão aquecidas a 99°C por 3 minutos para serem abertas e levadas ao gelo sendo imediatamente depois aplicadas no gel.

III.5 PCR em tempo real

Após a contagem em câmara de Neubauer do número de parasitas da amostra de cultura de células, fizemos a extração do DNA das formas promastigotas. A partir daí, foram feitas diluições em triplicata, partindo de 10^6 , 10^5 , 10^4 até atingir 10^{-3} (parasitas/ml). Após a extração do DNA de cada amostra fizemos a PCR em tempo real utilizando os oligonucleotídeos F13A e F13B (Rodgers et al., 1990), que amplificam um produto de PCR em 120bp. Foi utilizada a plataforma ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo o protocolo descrito por Nicolas et al. (2002), com algumas modificações nos ciclos, a reação ocorreu da seguinte forma: 50° por 2min, 95° por 2min para a

desnaturação do DNA, seguidos pela amplificação utilizando 40 ciclos de 10s a 95°C, 10s a 56°C e 30s a 72°C e para finalizar o ciclo de “melting” dado pela maquina, de 15s a 95°C, 30s a 60°C e 15s a 95°C. Utilizamos a tecnologia do “SybrGreen” (Applied Biosystems, Foster City, CA), que é um sistema de detecção não específica baseada em um DNA dupla fita (dsDNA) intercalado e aplicável para todos os alvos potenciais.

III.6 Análise estatística

IV. RESULTADOS

A PCR realizada a partir de amostra de sangue de cão infectado (Figura 6, amostra 5) amplificou um único fragmento de aproximadamente 720bp. Esta amostra foi utilizada como controle positivo em todas as reações posteriores. Como controle negativo, utilizamos DNA proveniente de cão residente de área não endêmica (Figura 6, amostra 6). Não foram observadas amplificações inespecíficas em nenhuma das amostras de campo. O único fragmento amplificado consiste no DNA de cinetoplasto de *L. chagasi*.

O fragmento amplificado referente à amostra 5 da figura 6 foi seqüenciado como descrito em Matérias e Métodos. A comparação da seqüência obtida com o banco de dados GeneBank mostra que o fragmento amplificado representa o DNA do cinetoplasmtto de *Leishmania chagasi*. A seqüência mostra alta similaridade (99%) com seqüências depositadas para este parasita.

Dos 85 casos de Bauru, 53 (62,4%) foram positivos pela RIFI (título maior ou igual a 40), e 57 (67,1%) por PCR. Dos 53 casos que foram considerados positivos pela sorologia (RIFI), 43 (81,1%) produziram resultados positivos por PCR. Dos 36 casos que foram negativos pela RIFI, 17 (47,2%) produziram resultados positivos pela PCR. Dos 60 casos que produziram resultados positivo por PCR, 43 (71,7%) produziram resultados positivos tanto pela PCR quanto pela RIFI, enquanto 17 (28,3%) produziram resultados positivos pela PCR e negativos pela RIFI (Tabela 1).

Dos 4 casos de Piracicaba, todas as amostras deram resultado negativo pela RIFI enquanto que 3 (75%) deu resultado positivo pela PCR (este resultado esta na tabela 1, juntamente com as amostras de Bauru, pois foram feitos pela mesma metodologia).

Para o estudo comparativo entre a PCR e a RIFI foram realizados os cálculos matemáticos conforme segue:

Positivos verdadeiros 43/89 - 48,3% - (95% I.C. 0,379< PV<0,587)

Negativos verdadeiros 19/89 - 21% - (95% I.C. 0,128<NV<0,299)

Falsos positivos - 17/89 = 19%

Falsos negativos - 10/89 = 11%

Acurácia - $62/89 = 70\%$ (95% I.C. $0,601 < AC < 0,792$)

Kappa = 0,35

Sensibilidade = 81,1% (43/53)

Especificidade = 52,8% (19/36)

X^2 : Pearson = 11,22 (P=0,0008)

Yates = 9,731 (P=0,0018)

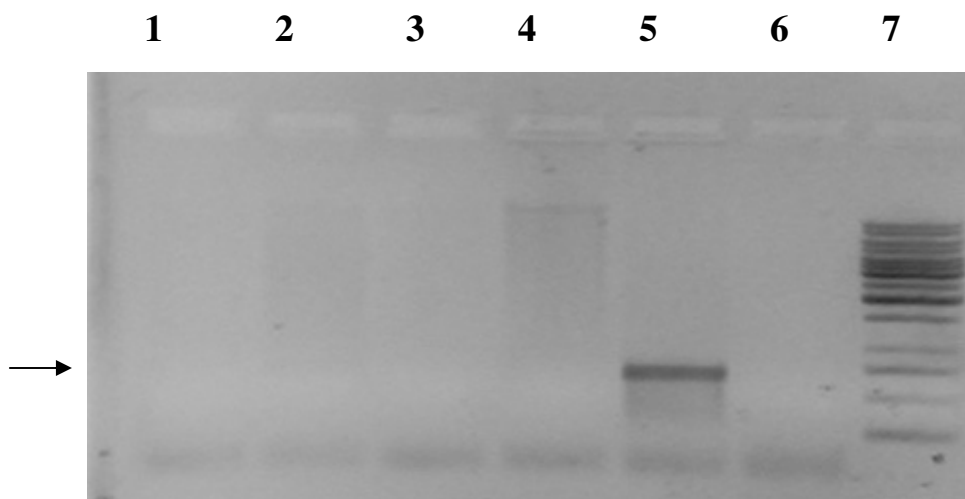


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das amostras de Bauru.

Após a reação, 5 μ l das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e após a eletroforese o DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Lane 1-4, amostras de sangue de cão de Bauru, Lane 5 controle positivo, Lane 6, controle negativo, Lane 7, marcador de peso molecular de 1kb.

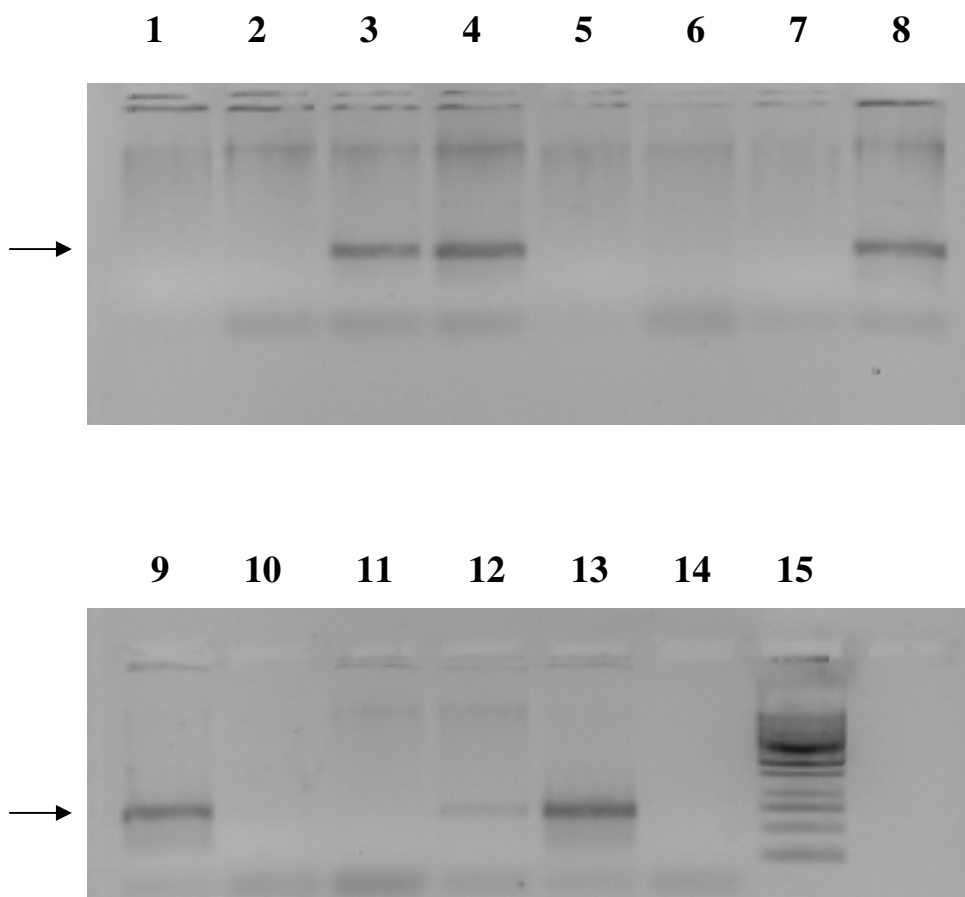


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das amostras de Bauru.

O DNA das amostras de sangue de cão foi submetido à PCR utilizando os oligonucleotídeos LIN 19 e LIN R4 como descrito em materiais e métodos, ítem III.4. Após a reação, 5 ul das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e após a eletroforese o DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Lane 1-12, amostras de sangue de cão de Bauru, Lane 13 controle positivo, Lane 14, controle negativo, Lane 15, marcador de peso molecular de 1kb.

		RIFI		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	43	17	60
	Negativo	10	19	29
Total		53	36	89

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos pela PCR e pela RIFI.

Dos 73 casos de Araçatuba, 12 foram testados por ELISA, sendo que 10 produziram resultado positivo (83,3%). Destas 12 amostras, todas foram positivas pela PCR, que alcançou 100% de positividade. O restante das amostras, 61 no total, foram amostras que tinham dado resultados positivos por ELISA e ao serem testadas pela PCR, 57 destas amostras deram resultados positivos pela PCR (93,4%) enquanto que 4 amostras deram resultado negativo (Tabela 2).

No estudo comparativo entre a PCR e o teste de ELISA não foi possível fazer os cálculos matemáticos uma vez que não tiveram amostras coincidentes negativas entre os métodos. A acurácia foi de 92%.

		ELISA		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	67	2	69
	Negativo	4	0	4
Total		71	2	73

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos pela PCR e pelo teste de ELISA.

IV.1 PCR em tempo real

A reação de amplificação em tempo real representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira a tarefa de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma, capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. O equipamento utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação. A fluorescência eventualmente produzida pela amostra é detectada pelo sistema e o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (background) é denominado CT (threshold cycle). O CT não é um ciclo, mas um momento na reação, que pode ocorrer em qualquer intervalo entre um ciclo e outro do PCR. Correlacionando-se o log da concentração de DNA (em número de cópias) com o momento em que a quantidade de luz de cada tubo atinge um determinado limiar, obtém-se uma curva de amplificação. Uma maneira comum de revelação fluorescente do produto amplificado consiste na utilização do agente SybrGreen I, que se liga de maneira inespecífica ao DNA em fita dupla. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida em que o DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante SybrGreen I entre as cadeias de DNA geradas. A presença de DNA dupla fita na solução é capaz de aumentar essa emissão de luz em até 100 vezes para uma mesma concentração de SybrGreen I.

Com os valores do CT construímos uma curva padrão e calculamos o limiar de detecção do método, que foi de até 1 parasita/ml. A detecção limite de 1 parasita/ml é considerado altamente satisfatório para amostras de sangue (Spanakos et al, 2002).

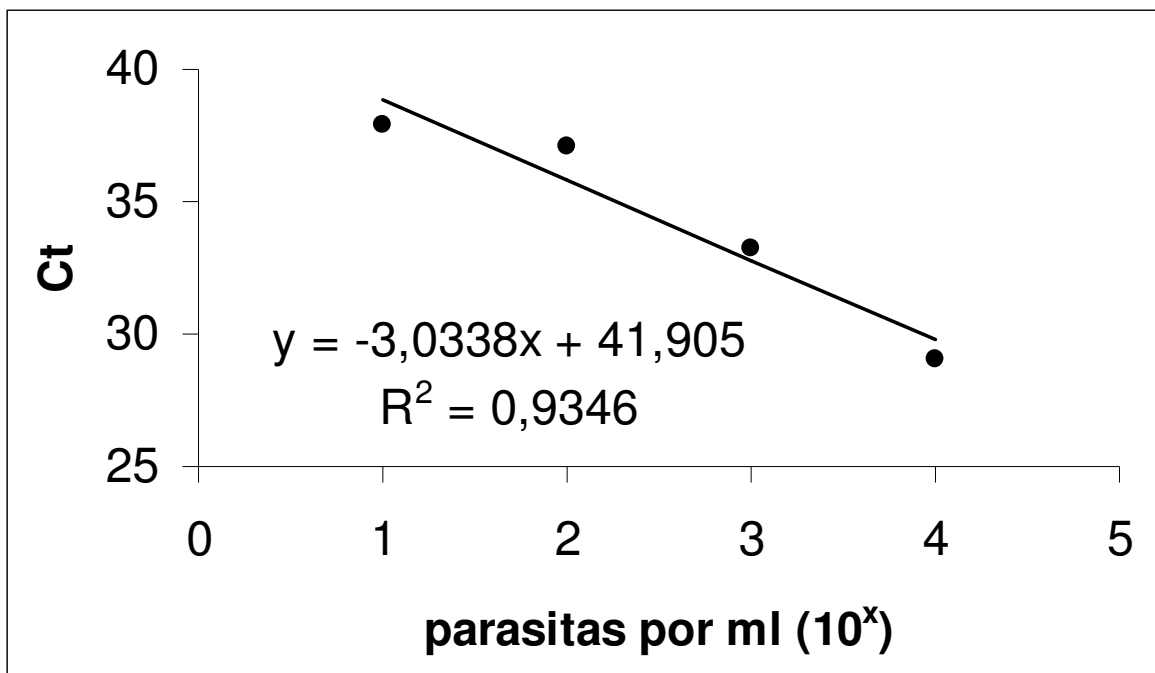


Figura 8. Limiar de detecção do método.

V. DISCUSSÃO

Muitos ensaios podem ser usados para identificar *Leishmania spp.*, incluindo análise de padrões de isoenzimas (Kreutzer and Christensen, 1980; Cupolillo et al., 1994) e análises no soro usando anticorpos monoclonais espécie-específicos (Grimaldi et al., 1987). Estes métodos têm largamente contribuído para o conhecimento epidemiológico da *Leishmania spp.*; entretanto, devido a necessidade de cultivar o parasita e outros procedimentos longos, eles são apenas utilizados para diagnóstico de rotina. O advento da PCR trouxe a possibilidade de ganho no diagnóstico e na informação genética desejada com um simples ensaio devido a sua extraordinária eficiência e rapidez para amplificar fragmentos do DNA do parasita (Disch et al., 2006).

O ensaio de PCR que foi utilizado em nossas amostras clínicas foi selecionado baseado em critérios de sensibilidade, especificidade e simplicidade. Um parâmetro crucial foi a habilidade de identificar o produto de DNA pela simples observação visual sem a necessidade de hibridização, o que adicionaria complexidade ao processo. A hibridização do DNA poderia aumentar o limite de detecção do teste, entretanto ele já é naturalmente aumentado devido à presença de múltiplas cópias da área alvo em cada parasita. Para facilitar a identificação visual dos “amplicons”, nós evitamos utilizar oligos que amplificam seqüências curtas do DNA, e ensaios de PCR que podem produzir produtos de DNA de tamanho similar com os “amplicons” esperados. Esta última consideração tem um significado especial, uma vez que o DNA do cinetoplasto, que foi escolhido como DNA alvo da combinação final de oligos, inclui uma região variável que se esperava causar uma considerável variação no tamanho dos produtos amplificados, dependendo da espécie e algumas vezes até da cepa de *Leishmania spp.*, sob estudo (Rodgers et al., 1990; Spithill and Grumont, 1984).

Para a seqüência de oligos, nós escolhemos o DNA da região do cinetoplasto da *Leishmania*, kDNA, onde o DNA está disposto como minicírculos e maxicírculos. Minicírculos são pequenas moléculas de DNA circular de 800 pares de base encontrados no cinetoplasto. Os minicírculos do cinetoplasto provêm um alvo molecular ideal para a

detecção de *Leishmania* porque eles estão presentes em milhares de cópias (10.000/parasita) e permitem diferenciação entre espécies (Disch et al., 2006).

Uma variedade de protocolos para detectar *L. infantum* tem sido desenvolvidos, e a técnica da PCR tem mostrado ser uma técnica sensível e altamente específica para a detecção de infecções sintomáticas ou provadas parasitologicamente (Ashford et al., 1995; Quinnell et al, 2001; Zerpa et al, 2000). Evidências sugerem que a PCR é menos sensível para detectar cães assintomáticos (Ashford et al., 1995; Quinnell et al., 2001).

A sensibilidade e a especificidade do ensaio da PCR dependem de vários fatores, incluindo os oligos, o protocolo de extração do DNA e o tipo de amostra (Lachaud et al., 2001; Reithinger et al., 2000). A vantagem de usar sangue periférico é que a coleta é menos invasiva do que sangue da medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo, e as amostras estão prontas para serem utilizadas. Por outro lado, o nível de parasita no sangue periférico tende a ser menor do que a quantidade de parasita encontrado na medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo, além disso, o sangue pode conter inibidores (ex: grupos heme) que podem afetar a sensibilidade do ensaio da PCR (Reithinger et al., 2002).

Baseado na validação de relatórios anteriores sobre a técnica em estudo, e os resultados obtidos nas condições mencionadas acima, a combinação de oligonucleotídeos proposta permite fácil, rápida e direta detecção de DNA de *Leishmania spp.* de material clínico, sem a necessidade de utilizar técnicas complexas e demoradas.

A fim de completar a avaliação do ensaio de PCR normalmente feito para a detecção de DNA de *Leishmania* de material clínico, nós incorporamos um considerável numero de amostras clínicas de cães suspeitos de leishmaniose de cidades do interior do estado de São Paulo. Nossa quantidade de amostras não suporta o propósito de triagem clínica, que não foi o objetivo deste estudo, mas pode substanciar a acurácia dos resultados adquiridos pelo método padrão proposto.

A comparação dos resultados obtidos pela sorologia e pela técnica de PCR feitos na mesma amostra sangüínea (Tabela 3), mostram 87% de concordância, com 141 dos 162 casos produzindo resultados idênticos tanto pela PCR quanto pela sorologia. A concordância entre os resultados positivos e negativos produzidos por cada método foi 88,7% (110/124) e 52,8% (19/36). Estes resultados indicam alta discrepância entre a PCR e

a sorologia para os casos negativos. Isso pode acontecer devido a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasita circulante no sangue no momento da coleta e consequentemente não detectado pela PCR, inibidores da PCR presentes no sangue ou ainda devido a reações cruzadas da sorologia com outras doenças (doença de Chagas, bactérias, alguns tipos de vírus, etc...).

Por outro lado, a imunodeficiência de alguns cães e a resultante inabilidade de produzir suficiente quantidade de anticorpos, pode contribuir para os 4 resultados positivos pela PCR dos casos que reagiram negativos pela RIFI, uma discrepância que também tem sido reportada por outros (Reale et al. 1999; Berrahal et al. 1996). Discrepância entre os resultados da RIFI e da PCR feitas em amostras correspondentes pode ser atribuída à imunodeficiência que acompanha a leishmaniose, possível erro na manipulação das amostras, muito comum na coleta de linfonodo e medula óssea, ou finalmente o fato de que os antígenos do parasita não são uniformemente distribuídos através do corpo.

Todavia, a utilização de sangue de cão apresenta dificuldades, e certamente mais do que em sangue humano; em particular, a lise e o método de extração tem que ser especialmente otimizado a fim de reduzir a taxa de inibição e aumentar a especificidade da reação (Lachaud et al., 2002).

Testes sorológicos são bem sucedidos na detecção da leishmaniose visceral, mas a baixa resposta humoral característica dos indivíduos assintomáticos frequentemente coloca seus níveis de anticorpos abaixo da linha de corte (cut-off) ou no seu limite de detecção. Um resultado positivo em técnicas imunológicas não necessariamente representa uma infecção ativa e pode apenas indicar uma exposição prévia ou um contato com a *Leishmania*, o que é particularmente comum em áreas endêmicas. Assim como, um resultado negativo não descarta a infecção, principalmente nas formas ocultas (Riera et al, 2003).

Amostras de sangue são um tipo de material clínico confiável para a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR. Esta observação esta em concordância com relatórios prévios (Hu et al., 2000; Reale et al., 1999) e pode ser atribuída à simplicidade da coleta de sangue, que faz este procedimento menos sujeito a erros. Além disso, amostras de sangue

permitem o exame uma maior quantidade de volume de amostra do que amostras de medula óssea, que é sempre sugerido como tipo ideal de material clínico para a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR (Bettini et al., 1990).

O exposto acima é de significativo uso prático, uma vez que a coleta de sangue periférico é muito menos invasiva e de longe mais aceitável pelos donos de cães do que a punção de medula óssea ou de linfonodo, para coletar a amostra de sangue. Entretanto, apesar do tipo específico de material clínico que será finalmente selecionado, os resultados acima indicam que é significativo aplicar repetidas amostras, por exemplo adquirir várias amostras de tempos em tempos a fim de aumentar o valor preditivo da PCR incorporado ao diagnóstico de leishmaniose (Ikonomopoulos, J. et al., 2003).

Estudos anteriores já demonstraram que a PCR pode dar resultado negativo em amostras de 30ml de sangue, sugerindo que nem toda amostra de 30ml de sangue contém seqüências alvo do DNA de cinetoplasto das formas amastigotas, mesmo que teoricamente a amplificação de DNA de cinetoplasto possa detectar 1 parasita em 1.000.000 de células. Estes resultados indicam que a densidade de *Leishmania* no sangue periférico é baixa e que a parasitemia é provavelmente episódica (Fichoux et al., 1999).

Em relação a usar a técnica de PCR em tempo real para diagnóstico, estudos indicaram que quando altos níveis de parasitas no momento do diagnóstico são levados em consideração, a PCR em tempo real não oferece uma vantagem decisiva para o diagnóstico inicial da leishmaniose visceral (Mary et al., 2004).

VI. CONCLUSÕES

Podemos sugerir que o ensaio padrão de PCR proposto é uma ferramenta confiável para a detecção de DNA de *Leishmania* de material clínico. O ensaio produz um resultado em apenas 4-6 horas e não envolve material biológico perigoso ou procedimentos complexos e demorados. Além disso, a aplicação desse método tem provado que ele pode resolver os problemas diagnósticos resultantes da baixa sensibilidade do exame ao microscópio e o baixo valor preditivo positivo e negativo da sorologia, normalmente atribuído a anticorpos persistentes ou imunossupressão, respectivamente.

Os resultados discrepantes encontrados podem ser devido a vários fatores, entre eles: a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasita circulante no sangue no momento da coleta e consequentemente não detectado pela PCR, imunodeficiência de alguns pacientes e a resultante inabilidade de produzir anticorpos, inibidores da PCR presentes no sangue ou ainda devido a reações cruzadas da sorologia com outras doenças (doença de Chagas, bactérias, alguns tipos de vírus, etc...).

Quando a PCR dá um resultado positivo, não é preciso repetir e podemos afirmar com certeza que o cão pesquisado tem o parasita (*Leishmania*) no sangue, pois não existe o falso-positivo, uma vez que os oligonucleotídeos são específicos para a *Leishmania*. Por outro lado, um resultado negativo deve ser repetido, de preferência em uma segunda extração da mesma amostra (extração feita em duplicata ou triplicata). De qualquer forma, um resultado negativo pode significar que o cão não tem o parasita, mas isso não poderá ser afirmado com certeza, devido aos fatores já discutidos anteriormente.

A PCR é uma técnica rápida e específica (não há possibilidade de reação cruzada), além de ser muito sensível, o que a torna uma grande aliada no diagnóstico da leishmaniose visceral. Independentemente do tipo específico de amostra utilizada, para os casos negativos por PCR, o ideal seria coletá-las com algum intervalo de tempo, a fim de aumentar o valor preditivo da técnica. A utilização de um par de oligos adicionais poderia aumentar a sensibilidade e a eficácia da técnica para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, R.P., Barral-Netto, M., De Jesus, A.M., De Freitas, L.A., Carvalho, E.M., Barral, A., (1996). Biological behaviour of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54, 178-184.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25, 3389–3402.

Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 1933–1938.

Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraeve, W., Barker Jr., R.H., Badaró, R., David, J.R., (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53, 251-255.

Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F.P., Harris, E., (1999). PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **J. Parasitol.** 85, 181–187.

Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi, J.G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaró, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 44, 536-546.

Belli, A., Garcia, D., Palacios, Z., Rodriguez, B., Valle, S., Videa, E., Tinoco, E., Marin, F., Harris, E., (1999). Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61, 380-385.

Bem-Ismael, A., Smith, D.F., Ready, P.D., Ayadi, A., Gramiccia, M., Bem-Osman, A., Bem-Rachid, M.S., (1993). Sporadic cutaneous leishmaniasis in north Tunisia: identification of the causative agent as *Leishmania infantum* by the use of a diagnostic deoxyribonucleic acid probe. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 86, 508-510.

Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S., (1996). Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 55, 273–277.

Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Biggio, P., Loi, R., Cottoni, F., Pau, M. and Atzeni, M.C., (1990). Leishmaniasis in Sardinia. IV. Epidemiological appraisal of cutaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates. **J. Trop. Med. Hyg.** 93, 262–269.

Bryceson, A.M., (1996). Leishmaniasis. In Manson's Tropical diseases. **Ed. G.C. Cook. London: W.B. Saunders**, 1214-1243.

Costa, J.M., Durand, R., Deniau, M., Rivollet, D., Izri, M., Houin, R., Vidaud, M., Bretagne, S., (1996). PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Clin. Microbiol.** 34, 1831-1833.

Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., (1994). A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 50, 296-311.

de Beer, P., el Harith, A., van Grootheest, M., Winkler, A., (1990). Outbreak of kala-azar in the Sudan. **Lancet** 335, 224.

Desjeux, P., (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 27, 305-318.

Disch, J., Caligiorne, R.B., Maciel, F., Oliveira, M.C., Orsini, M., Neto, E.D., Rabello, A., (2006). **Diag. Microbiol. and Inf. Dis.** 56, 395-400.

Duxbury, R.E., Sadun, E.H., (1964). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 13, 525-529.

El-Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Kiugu, S., Laurmua, J.J., (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 80, 583-587.

Evans, T.G., Teixeira, M.J., Mcauliffe, I.T., (1992). Epidemiology of visceral Leishmaniasis in Northeast Brazilian. **J. Inf. Dis.** 166, 1124-1132.

Fassina, S.F.C., Kanamura, H. Y. (O), Contribuição da Biologia Molecular no diagnóstico da Leishmaniose visceral.

Ferrer, L.M., Clinical aspects of *Leishmaniasis*. Canine Leishmaniasis: an update. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, (1999), pp. 6–11.

Fichoux, Y.L., Quaranta, J-F., Aufeuvre, J-P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., Kubar, J. (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **J. Clin. Microbiol.** 1953-1957.

Frank, C., Hadziadoniou, M., Pratlong, F., Garifallou, A., Rioux, J.A., (1993). *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 87, 184-185.

Gallego, L.S., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infections in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.** 39, 560-563.

Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian, N., (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J. Clin. Microbiol.** 36, 1989–1995.

Ho, M., Leeuwenburg, J., Mbugua, G., Wamachi, A., Voller, A., (1983). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 32, 943-946.

Hu, X.S., Yang, W.T., Lu, H.G., Yan, H.P., Cheng, J.P., Ma, Y., Jin, B.Q., Zhang, T., (2000). Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.** 86, 822–826.

Hyams, K.C., Hanson, K., Wignall, F.S., Escamilla, J., Oldfield, E.C., (1995). The impact of infectious diseases in the health of U.S. troops deployed to Persian Gulf during operations Desert Shield and Desert Storm. **Clin. Infect. Dis.** 20, 1497-1504.

Ikonomopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G., (2003). Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Vet. Parasitol.** 113, 99-113.

Kreutzer, R.D., Christensen, H.A., (1980). Characterization of *Leishmania* spp. By isoenzyme electrophoresis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 29, 199-208.

Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Mauboussin, J.M., Oziol, E., Dedet, J.P., Bastien, P., (2000). Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.** 38, 236-240.

Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamothe, J., Bastien, P., (2001). Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **J. Clin. Microbiol.** 39, 613-617.

Lachaud, L., Hammami, S.M., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., (2002). Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 210-215.

Lambson, B., Smyth, A., Barker, D.C., (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. **Exp. Parasitol.** 94, 15–22.

Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M.E., (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.** 109, 19-27.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, NY, 1456–1459.

Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N.D., Beck, H.P., Felger, I., (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 46, 115-124.

Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H., (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **J. Clin. Microbiol.**, 5249-5255.

Mathis, A., Deplazes, P., (1995). PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania spp.* in diagnostic samples from humans and dogs. **J. Clin. Microbiol.** 33, 1145-1149.

Mebrahtu, Y., Lawyer, P., Githure, J., Were, J.B., Muigai, R., Hendricks, L., Leeuwenburg, J., Koech, D., Roberts, C., (1989). Visceral leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 41, 289-294.

Ministério da saúde. Brasil, (2006). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.**

Muller, N., Zimmermann, V., Forster, U., Bienz, M., Gottstein, B., Welle, M., (2003). PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Vet. Parasitol.** 114, 223-229.

Neves, V.L.F.C., (2005). Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo. **ComCiência**, reportagens.

Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. **J. Clin. Microbiol.** 40, 1666-1669.

Noyes, H., Chance, M., Ponce, C., Ponce, E., Maingon, R., (1997). *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. **Exp. Parasitol.** 85, 264-273.

Nuzum, E., White III, F., Thakur, C., Dietze, R., Wages, J., Grogl, M., Berman, J., (1995). Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **J. Infect. Dis.** 171, 751-754.

Orsini, M., Silva, M., Luz, Z.M., Disch, J., Fernandes, O., Moreira, D., Guedes, A.C., Rabello, A., (2002). Identification of *Leishmania chagasi* from skin in Leishmania/HIV co-infection: a case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35, 259-262.

Piarroux, R., Azaiez, R., Lossi, A.M., Reynier, P., Muscatelli, F., Gambarelli, F., Fontes, M., Dumon, H., Quilici, M., (1993). Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 49, 364–369.

Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B., Quilici, M., (1994). Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **J. Clin. Microbiol.** 32, 746–749.

Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A., Dye, C., (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology** 122, 253-261.

Ramos, A., Maslov, D.A., Fernandes, O., Campbell, D.A., Simpson, L., (1996). Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. **Exp. Parasitol.** 82, 242–250.

Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.** 37, 2931–2935.

Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Davies, C.R., (2000). Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. **J. Clin. Microbiol.** 38, 748-751.

Reithinger, R., Espinoza, J.C., Courtenay, O., Davies, C.R., (2003). Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J. Clin. Microbiol.** 41, 1486-1493.

Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gállego, M., Portus, M., (2003). Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 98, 102-110.

Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasit.** 71, 267-275.

Roura, X., Sanchez, L., Ferrer, L., (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Vet. Rec.** 144, 262-264.

Sanchez, J.M., Lopez, M.C.L., Sanchez, C.A., Fajardo, J.J.C., Pineda, J.A., Marquez, F.M., (2001). Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Parasitology** 122, 607-615.

Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C.L., (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 47, 349-358.

Singh, N., Curran, M.D., Rastogil, A.K., Middleton, D., Sundar, S., (1999). Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* speci-ficity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Trop. Med. Int. Health** 4, 448-453.

Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., Basu, D., De Bruijn, M.H., Adhya, S., Mallik, K.K., Barker, D.C., (1992). Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology** 105, 183–192.

Spanakos, G., Patsoula, E., Kremastinou, T., Saroglou, G., Vakalis, N., (2002). Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. **Molecular and Cellular Probes** 16, 415-420.

Spithil, T.W. and Grumont, R.J., (1984). Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. **Mol. Biochem. Parasitol.** 12, 217–236.

WHO, (2000). The World Health Report. **World Helth Organization**, Geneva, Switzerland.

WHO, (2001). The World Health Report. **World Helth Organization**, Geneva, Switzerland.

Xiao-Su, H., Wen-tian, Y., Hong-gang, L., He-ping, Y., Jian-ping, C., Ying, M., Bao-qian, J., Tao, Z., (2000). Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.** 86, 822-826.

Zerpa, O., Ulrich, M. Negron, E., Rodriguez, N., Centeno, M., Rodriguez, V., Barrios, R.M., Belizario, D., Reed, S., Convit, J., (2000). Canine visceral leishmaniasis on

Margarita Island (Nueva Esparta Venezuela). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 94, 484-487.

Zijlstra, E.E., Siddig, A.M., El-Hassan, A.M., El-Toum, I.A., Satti, M., Ghalib, H.W., Kager, P.A., (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 86, 505-507.