

**RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS**

**Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas**

**RECIFE - PE**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas**

**RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

**RECIFE - PE**

**2012**

RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E DA PCR EM  
TEMPO REAL (qPCR) NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA UTILIZANDO DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 23/03/2012

Banca examinadora:

---

Dr. Leucio Câmara Alves

DMV/UFRPE/PE - Orientador

---

Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho Silva

UAG/UFRPE/PE

---

Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino

DMV/UFRPE/PE

---

Dr. Marco Antonio Granja Barbosa

Médico Veterinário Autônomo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir tantas conquistas em minha vida.

A meus pais Maria Isabel do Nascimento Ramos e Everaldo da Silva Ramos que abdicaram de muitas coisas na vida para me propiciar este momento.

Agradeço a meus irmãos Ingrid Carla do Nascimento Ramos e Carlos Alberto do Nascimento Ramos que sempre foram exemplos os quais eu procuro seguir tanto na vida profissional quanto pessoal.

À Thiara Ramona Cavalcante de Andrade por toda importância que representa em minha vida.

Ao Professor e amigo Leucio Câmara Alves por ter me guiado durante toda minha vida acadêmica e ter me ensinado a superar os obstáculos que a vida muitas vezes nos impõe.

À Professora Maria Aparecida da Gloria Faustino que muito me ensinou durante esses anos de convivência.

Às pessoas que fazem e fizeram parte do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos durante todo este período e que me propiciaram bons momentos: Andréa, Alessandra, Ana Maria, Antônio, Carlos, Danillo, Edna, Eduardo, Elizete, Fernanda, George, Gilsan, Guiomar, Hévila, Inês, João, Jonatas, Juliana, Júlio, Marcello, Márcia, Marco, Maria Luiza, Mariana França, Marilene, Marília, Nadine, Neurisvan, Pedro, Rebeka, Rita, Rodrigo, Sandra, Tadeu, Thyara, Vinícius, Vítor, Wagner e Whaubtyfran.

À equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal que contribuíram em parte para execução deste trabalho: Arvelino, Carla, Luis, Márcia, Márcia Jusi, Márcia Teixeira, Marcos, Meyre, Munhoz, Rafaela, Tatiana e a Professora Rosangela Zacarias Machado (UNESP-Jaboticabal).

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC –EMBRAPA) em especial ao Dr. Flabio Ribeiro de Araújo, Carlos Alberto e Elaine de Pádua.

À Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito e a Dra. Milena de Paiva Cavalcanti do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CpqAM-FIOCRUZ) pela cessão de uma alíquota da cultura de *L. infantum* utilizada neste estudo.

À todos meus amigos da graduação e mestrado com quem convivi durante anos, onde passamos momentos felizes e tristes, aborrecimentos e boas conversas mas nunca deixamos de estar juntos. Todos vocês serão para sempre lembrados.

Aos amigos que fiz pelos corredores do Departamento de Medicina Veterinária, tanto alunos como os técnicos, espero levar boas recordações de todos vocês durante toda minha vida.

Aos professores que tenho como exemplos profissionais e a quem serei grato pela grande contribuição que deram a minha formação, em especial aos Professores Frederico Celso Lira Maia, Gílcia Aparecida de Carvalho Silva, Jean Carlos Ramos da Silva, Leonildo Bento Galiza e Rinaldo Aparecido Mota.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta conquista.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 2</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Sinais clínicos observados nos animais naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> .	50
<b>Figura 2.</b> Número de parasitos/mL expressos em log 10 de acordo com o grupo clínico.	51
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Figura 1.</b> Curva padrão construída a partir de diferentes diluições de DNA de <i>L. infantum</i> expressas em número de parasitos/mL.	60
<b>Figura 2.</b> Quantidade média de parasitas nos animais positivos na qPCR de acordo com o grupo clínico.	62

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Tabela 1.</b> Resultados da PCR e qPCR em diferentes amostras biológicas de animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.	38
<b>Tabela 2.</b> Resultados da PCR e qPCR em animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.	38
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Tabela 1.</b> Quantidade média de parasitos/mL em cães de diferentes grupos clínicos.	52
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Tabela 1.</b> Ct médio, desvio padrão, média de parasito/mL e classificação clínica dos animais positivos.	61

## RESUMO

Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma importante zoonose parasitária endêmica no Brasil, causada pelo protozoário denominado *Leishmania infantum*. Em áreas urbanas, os cães são considerados os principais reservatórios deste parasito. Sendo assim, a importância destes animais no ambiente urbano tem estimulado a realização de numerosos estudos para avaliação de técnicas de diagnóstico. Entre os estudos, vários têm proposto ferramentas moleculares (ex. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR)) como importantes métodos para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. No entanto, pouco se sabe sobre qual amostra biológica é mais viável, considerando que várias podem ser utilizadas (ex. medula óssea, linfonodo, baço, pele). Assim, os objetivos deste estudo foram: i) determinar o desempenho da PCR e qPCR no diagnóstico da LVC utilizando diferentes amostras biológicas; ii) quantificar a carga parasitária na medula óssea, linfonodo, baço e pele de cães relacionando-a com os sinais clínicos apresentados pelos animais. Para tanto, foram utilizados cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de uma área endêmica. Amostras de medula óssea, linfonodo, baço e pele foram coletadas para avaliação da PCR e qPCR, e quantificação da carga parasitária. No presente estudo, qPCR foi capaz de detectar um grande número de animais positivos em comparação da PCR. Não se observou diferença significativa entre as amostras biológicas na comparação da PCR e qPCR. Considerando a carga parasitária em diferentes amostras biológicas, não foi observada diferença significativa, por outro lado, de acordo com os diferentes grupos clínicos foi detectada diferença significativa. Os achados do presente estudo sugerem que a carga parasitária na medula óssea, linfonodo, baço e pele é maior nos animais que apresentam um maior número de sinais clínicos (carga parasitária nos animais polissintomáticos > carga parasitária nos animais oligossintomáticos > carga parasitária nos animais assintomáticos). Além disso, considerando a facilidade de obtenção, sugere-se o linfonodo como a amostra mais viável para a detecção molecular de *L. infantum* em cães.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, diagnóstico, molecular



## ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an important parasitic zoonosis endemic in Brazil, caused by the protozoa known as *Leishmania infantum*. In the urban area, the dogs are considered the main reservoir of this parasite. Thus, the importance of dogs in the urban environment has stimulated numerous studies for the assessment of diagnostic techniques. Among these studies, several have proposed the molecular tools (e.g. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real time PCR (qPCR)) as important methods for diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs. However, little is known about the better biological samples used in these techniques, considering that several samples may be utilized (e.g. bone marrow, lymph node, spleen, skin). Hence, the aims of this study were i) to determine the performance of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) in the diagnosis of CVL using different biological samples; ii) to quantify the parasite load in the skin, bone marrow, lymph node and spleen of dogs and relate the findings to clinical status. For such, infected dogs by *L. infantum* from an endemic area were utilized. Samples of bone marrow, lymph node, spleen and skin were collected by assessment of PCR and qPCR, and quantification of parasite load. In the present study, qPCR was able to detect a greater number of positive animals in comparison to PCR. No significant differences between biological samples were found in the detection of *L. infantum* DNA using PCR or qPCR. Considering the parasite load on different biological sample, it was not observed significant difference, on the other hand, among the clinical group was detected significant difference. The findings of the present study suggests that the parasite load on bone marrow, lymph node, spleen and skin is greater among those dogs with more clinical signs (parasite load on polysymptomatic animals > parasite load on oligosymptomatic animals > parasite load on asymptomatic animals). In addition, considering the easy of acquiring lymph node samples further demonstrates the greater viability of this biological material in the routine diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs.

**Key-words:** *Leishmania*, diagnosis, molecular

## SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Revisão bibliográfica	15
2.1	Agente etiológico	15
2.2.	Epidemiologia	15
2.3.	Distribuição geográfica	16
2.4.	Patogenia e sinais clínicos	18
2.5.	Diagnóstico	18
2.5.1.	Parasitológico	19
2.5.2.	Sorológico	19
2.5.3.	Molecular	20
3.	Referências	23
4.	Objetivos	31
4.1.	Geral	31
4.2.	Específicos	31
	CAPÍTULO 1	32
	Resumo	33
	Abstract	33
1.	Introdução	34
2.	Material e métodos	35
2.1	Aspecto ético	35
2.2.	Local e Animais	35
2.3.	Amostras biológicas	36
2.4.	Diagnóstico molecular	36
2.4.1.	Extração de DNA	36
2.4.2.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
2.4.3.	PCR em tempo real	36
2.5.	Análise dos dados	37
3.	Resultados	37
3.1.	Avaliação clínica	37
3.2.	PCR e qPCR	37
4.	Discussão	39
5.	Conclusões	41

6.	Referências	41
	CAPÍTULO 2	45
	Resumo	46
	Abstract	46
1.	Introdução	47
2.	Material e métodos	48
2.1.	Aspecto ético	48
2.2.	Local e animais	48
2.3.	Amostras biológicas	49
2.4.	Diagnóstico molecular	49
2.4.1.	Extração de DNA	49
2.4.2.	PCR em tempo real	49
2.4.3.	Análise dos dados	50
3.	Resultados	50
3.1.	Avaliação clínica	50
3.2.	PCR em tempo real	51
4.	Discussão	52
5.	Conclusão	53
6.	Referências	53
	CAPÍTULO 3	55
	Resumo	56
	Abstract	56
1.	Introdução	57
2.	Material e métodos	57
2.1.	Aspecto ético	57
2.2.	Local e animais	58
2.3.	Amostras biológicas	58
2.4.	Diagnóstico molecular	58
2.4.1.	Extração de DNA	58
2.4.2.	PCR em tempo real	59
2.4.3.	Análise dos dados	59
3.	Resultados	60
4.	Discussão	62

5.	Conclusões	63
6.	Referências	63
7.	Considerações finais	65
8.	Anexo	66

## 1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada uma das mais importantes zoonoses parasitárias, com ampla distribuição geográfica podendo ser encontrada na África, Ásia, Américas e Europa (DRUMOND e COSTA, 2011). Esta enfermidade possui como agente etiológico protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), estando inclusas neste complexo duas espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo esta última encontrada no Brasil.

A transmissão do agente etiológico da LV se dá principalmente pela ação hematófaga de dípteros pertencentes à subfamília *Phlebotominae* (DEANE e DEANE, 1962; MARZOCHI et al., 1985). Na Europa observa-se a ação de dípteros pertencentes ao gênero *Phlebotomus* e nas Américas ao gênero *Lutzomyia*, particularmente, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004).

A *L. infantum* possui hospedeiros no meio silvestre como canídeos, roedores e marsupiais, já no meio urbano, o cão doméstico considerado o principal reservatório do protozoário. Acredita-se que aproximadamente 50% dos cães infectados não apresentam sinais clínicos. Desta forma, o diagnóstico clínico nestes animais é inconclusivo, considerando também os sinais clínicos semelhantes a outras enfermidades (FERRER, 2002). Neste contexto, é imperativo a realização do diagnóstico laboratorial podendo este ser realizado por meio de técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares.

Os métodos parasitológicos são bastante específicos (LAURENTI, 2009) apresentando algumas limitações principalmente no que diz respeito à sensibilidade. Entre os métodos sorológicos no Brasil destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA). Embora muito utilizadas estas técnicas sorológicas apresentam a possibilidade de reação cruzada com outros agentes etiológicos.

Diante da baixa sensibilidade apresentada pelos métodos parasitológicos, e das reações inespecíficas verificadas nos testes sorológicos, as técnicas moleculares vêm adquirindo destaque, podendo ser aplicadas a variadas amostras biológicas (MICHALSKY et al., 2002). Dentre estas técnicas moleculares tem

destaque a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (OSHAGUI et al., 2009) e a PCR em tempo real (qPCR) (FRANCINO et al., 2006).

Desta forma, objetivou-se neste estudo avaliar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) na detecção e quantificação de *L. infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Agente etiológico**

O agente etiológico da LVC são protozoários da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* e complexo *Leishmania donovani*. Nas Américas, assim como na Europa, a espécie incriminada é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (DANTAS TORRES, 2006).

Trata-se de um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, apresenta uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor e outra com flagelo interno ou amastigota presente nos tecidos dos vertebrados (LITTLE, 2006).

### **2.2. Epidemiologia**

As infecções por *L. infantum* passaram por um processo de adaptação, inicialmente a transmissão do agente etiológico e o desenvolvimento da doença que ocorriam mais frequentemente em ambiente silvestre passam por um processo de urbanização (MONTEIRO et al., 2005), tornando-se endêmicas em ambientes urbanos (CAMARGO et al., 2007).

Dois principais motivos podem ser atribuídos a esta mudança. Em primeiro lugar, a adaptação do vetor ao ambiente urbano, em virtude das alterações ocorridas em seu habitat natural, seguido do êxodo rural aumentando a população urbana, que apresenta condições higiênico-sanitárias inadequadas favorecendo a proliferação do vetor (FEITOSA, 2002).

Sabe-se que os principais reservatórios da *L. infantum* no meio silvestre são os canídeos (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), assim como os marsupiais (*Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006), enquanto no meio urbano e rural, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o mais importante reservatório, sendo ao mesmo tempo um animal susceptível à infecção.

Desta forma, ao exercer o hematofagismo no hospedeiro vertebrado, o inseto vetor transfere formas promastigotas do parasito que são fagocitados pelos

macrófagos transformando-se em amastigotas e multiplicando-se. Com o rompimento dos macrófagos as amastigotas livres penetram nas células hospedeiras e disseminam-se do local da inoculação por via hematogênica ou linfática (LITTLE, 2006).

Uma vez instalada a infecção, o alto parasitismo cutâneo dos cães (MORENO e ALVAR, 2002) faz com que os vetores ao se alimentarem neste hospedeiro vertebrado, ingiram formas amastigotas, que no sistema digestório, se desenvolvem em promastigotas, estas multiplicam-se originando as formas paramastigotas que permanecem no esôfago e faringe do vetor onde diferenciam-se nas formas infectantes, as promastigotas metacíclicas.

No Brasil, os vetores da LVC são insetos pertencentes à família *Psychodidae* na qual a espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal transmissora desta enfermidade. Outra representante desta família, a *L. cruzi*, também foi considerada vetora da LVC nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MISSAWA et al., 2011).

A participação de outros artrópodes vetores vem sendo cada vez mais estudada, principalmente em áreas onde os prováveis vetores da doença não são encontrados (DANTAS TORRES, 2006). Neste sentido, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) já foi encontrado naturalmente infectado, sendo capaz de transmitir, em condições experimentais, os parasitos a roedores, abrindo novas perspectivas de estudo na epidemiologia da LVC (COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006).

Outras possíveis formas de transmissão também já foram relatadas como por meio do coito (SILVA et al., 2008) e a congênita (ROSYPAL et al., 2005). No entanto, pouco se sabe sobre a importância epidemiológica deste tipo de transmissão.

### **2.3. Distribuição geográfica**

A LVC é endêmica em todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul onde a doença é esporadicamente relatada (POCAI et al., 1998; MARCONDES et al., 2003; KRAUSPENHAR et al., 2007).



Na Região Sudeste inúmeros são os estudos realizados para determinar a prevalência da infecção por *L. infantum*. Pesquisa realizada por Silva et al. (2001) utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), determinou uma prevalência de 26,2% de anticorpos IgG anti-*L. infantum* em cães da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Neste mesmo local, por meio do teste ELISA, a prevalência foi de 15,9% (COURA-VITAL et al., 2011). Por outro lado, na cidade de Botucatu, São Paulo, por meio da RIFI, foi verificada uma prevalência de 22,0% (LANGONI et al., 2006).

No Centro-Oeste do Brasil o número de animais sororreagentes variou de 7,8% em Poxoréo, Mato Grosso (AZEVEDO et al., 2008), a 23,7% no município de Bonito, Mato Grosso do Sul (NUNES et al., 2001).

A situação na Região Norte se repete como nas outras áreas do país, no Estado de Roraima, em inquérito realizado por Guerra et al. (2004), 10,3% dos cães apresentaram anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

O nordeste é a região onde se encontra a maior prevalência da infecção canina (GONTIJO E MELO, 2004) concentrada, principalmente, nos estados do Piauí, Maranhão, Bahia e Ceará. O maior número de casos nesta região pode ser atribuído a fatores climáticos favoráveis que influenciam diretamente a epidemiologia do vetor (BAVIA et al., 2005).

Na cidade de São Luís (MA), Felipe et al. (2011) revelaram a presença de 47,8% dos cães sororreagentes. No estado de Pernambuco, França-Silva et al. (2003) obtiveram a prevalência de 35,9% para presença de anticorpos por meio da RIFI. No município de São Vicente Férrer, no mesmo estado, a prevalência da infecção canina variou de 4,8% a 33,3%, utilizando-se de métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO, 2005).

A enfermidade também vem sendo diagnosticada em áreas silenciosas, ou seja, onde não existe relatos da infecção em humanos. Cavalcanti et al. (2005) relataram pela primeira vez o calazar canino autóctone na Cidade do Recife. Já Albuquerque (2007) descreveu a LVC no município de Amaraji, microrregião Mata Meridional, do estado de Pernambuco.

## **2.4. Patogenia e sinais clínicos**

Há três características patogênicas principais nas infecções por *L. infantum*: Primeiro, o parasito inibe a atividade dos macrófagos, fazendo deste o seu sítio de replicação. Segundo, o estabelecimento e evolução da doença depende da resposta imunológica do hospedeiro. Terceiro, uma vez estabelecida, a infecção persiste nos tecidos, principalmente nos que possuem maior concentração de células do sistema fagocítico mononuclear (PALTRINIERI et al., 2010).

Além da presença do protozoário nos tecidos, a deposição de imunocomplexos em alguns locais é importante para caracterização da patogenia da doença, particularmente nas paredes dos vasos sanguíneos, olhos, rins, e articulações (GARCIA e ALONSO et al., 1996).

A imunidade à infecção por *L. infantum* dá-se através das populações de linfócitos B e T. A presença da resposta humoral está associada à doença clínica, enquanto que a resposta celular tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO e ALVAR, 2002).

Desta forma, é uma doença sistêmica crônica onde muitos animais podem apresentar-se assintomáticos. Nos animais que desenvolvem os sinais clínicos, estes podem aparecer de três meses a sete anos pós-infecção (LITTLE, 2006), sendo bem variáveis. Dentre os mais observados estão as alterações dermatológicas (FEITOSA et al., 2000), onde 68% dos cães acometidos apresentam tais alterações (CAVALCANTI et al., 2005).

Lesões oculares, incluindo ceratoconjuntivite e uveíte linfoplasmática ou granulomatosa também são frequentemente observadas (SLAPPENDEL, 1988; GARCIA-ALONSO et al., 1996; CIARAMELLA et al., 1997; PENA et al., 2000).

Outros sinais clínicos incluem onicogribose, caquexia, atrofia muscular, hepatoesplenomegalia, problemas articulares como a poliartrite auto-imune, polimiosite e lesões ósseas (ALBUQUERQUE et al., 2007).

## **2.5. Diagnóstico**

Dos animais infectados, 50% não apresentam sinais clínicos (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006), sendo inviável assim, a realização do diagnóstico clínico.

Desta forma o diagnóstico da LVC sempre deve ser realizado por meio de métodos laboratoriais, sendo estes basicamente divididos em diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular (ALMEIDA, 2009).

### **2.5.1. Parasitológico**

Este tipo de diagnóstico busca detectar a presença do protozoário podendo ser este por meio da visualização do parasito em amostras biológicas, realização de cultura de *Leishmania sp in vitro* e também pelo xenodiagnóstico.

É um diagnóstico bastante específico (LAURENTI, 2009), no entanto apresenta algumas limitações principalmente no que diz respeito à sensibilidade. Mesmo assim, quando se opta pela realização destes métodos, podem-se utilizar diferentes amostras biológicas, a saber: medula óssea, raspado de pele, aspirado de linfonodo, baço e fígado (KOUTINAS, 2001).

A cultura *in vitro*, por sua vez, pode ser realizada mediante diluição do material aspirado de medula óssea, baço e fígado em solução salina e inoculação no meio de cultura *Novy, Mc Neal e Nicolle* (NNN) e *Liver Infusion Tryptofane* (LIT), como a inoculação intraperitoneal em animais de laboratório (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997).

A desvantagem deste método é que requer um longo período de incubação, no entanto, é a única forma de isolar e manter a população original infectante (GRADONI e GRAMICCIA, 2008).

O xenodiagnóstico também é uma importante técnica disponível para a realização do diagnóstico da infecção por *L. infantum*, consiste em realizar repasto sanguíneo de flebotomíneos livres da infecção em cães supostamente infectados. Trata-se de uma técnica sensível e específica, entretanto, pouco aplicada na rotina diagnóstica (GRADONI e GRAMICCIA, 2008).

### **2.5.2. Sorológico**

Os cães infectados por *L. infantum* podem realizar a soroconversão de 1-22 meses após a infecção (OLIVA et al., 2006). Assim, diversas técnicas buscam detectar a presença de anticorpos IgG anti-*L. infantum* por meio dos testes sorológicos (FEITOSA et al., 2000).

Diferentes protocolos podem ser utilizados no diagnóstico sorológico, a saber: Fixação do Complemento (FC), Teste de Aglutinação Direta (TAD), Imunoeletroforese (FEITOSA et al., 2000), Immunoblot e Imunocromatografia (LIRA, 2005). No entanto, entre estes tipos de diagnóstico, duas técnicas no Brasil apresentam destaque, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), sendo estes recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2003).

A RIFI é reconhecida como “padrão ouro” para o diagnóstico LVC (GRADONI, 1999), sendo recomendado pelo Ministério da Saúde, embora possam ocorrer reações cruzadas, notadamente nas infecções por *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. (LIRA, 2005).

Na dependência do antígeno empregado e das condições da RIFI, sua sensibilidade pode variar entre 90% e 100% e a especificidade entre 80% a 100% (MANCIANTI et al., 1996).

Por outro lado, o teste ELISA também é bastante difundido por ser de fácil execução, embora seja um pouco mais sensível é um pouco menos específico que a RIFI, sendo considerado um teste de triagem (GONTIJO e MELO, 2004).

A especificidade do ELISA depende da natureza do antígeno utilizado (SUNDAR e RAI, 2000) como de culturas de promastigotas, ou proteínas recombinantes (BADARÓ et al., 1996). Assim, antígenos brutos das promastigotas ou seus extratos solúveis limitam a padronização dos testes e reprodutibilidade dos resultados, enquanto que antígenos recombinantes vêm mostrando elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC (SCALONE et al., 2002).

Segundo Alves e Bevilacqua (2004), a utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70, específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade do ELISA, e surgem como promissores para melhores resultados da técnica.

### **2.5.3. Molecular**

Cada vez mais o diagnóstico molecular vem adquirindo destaque, podendo ser aplicado a variadas amostras biológicas (MICHALSKY et al., 2002). Dentre estas

técnicas a PCR convencional (PCR) a PCR em tempo real (qPCR) vêm sendo cada vez mais utilizadas.

A Reação da Cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que tem a capacidade de reproduzir *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. Para realização desta técnica é necessário o conhecimento prévio do DNA alvo a ser amplificado (YANG e ROTHMAN, 2004). A sua execução pode ser realizada utilizando diversas amostras biológicas como material de biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodo, biópsia de pele, baço, fígado, pele e amostra de sangue (ARANSAY et al., 2000; HU et al., 2000).

Entre as diferentes amostras utilizadas na PCR existem divergências em relação a qual delas seria mais apropriada. Assim, de acordo com Ikononopoulos et al. (2003) o material proveniente de linfonodo é a melhor amostra a ser utilizada, enquanto Tasca et al. (2009) relataram que a pele mostrou-se como a amostra mais viável para detecção de *L. infantum* por meio da PCR.

A alta sensibilidade, especificidade e o tempo de execução da técnica são vantagens da PCR em relação aos outros métodos de diagnóstico tradicionais (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Mesmo assim, esta sensibilidade e especificidade dependem de vários fatores, tais como: escolha de *primers*, protocolo de extração de DNA, além da natureza do material a ser analisado (REITHINGER et al., 2000; LACHAUD et al., 2001).

Desta forma, apesar de ser um bom método de diagnóstico pode apresentar limitações que incluem resultados falso-negativos, relacionados com a presença de inibidores da PCR (YANG e ROTHMAN, 2004), além de problemas de operação como contaminações originando resultados falso-positivos.

Outra importante técnica molecular derivada da PCR é a PCR em tempo real (qPCR) que é um método baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes e permite o monitoramento em tempo real do produto amplificado, permitindo a análise dos resultados por meio de gráficos gerados no computador interligado ao termociclador (VASCONCELOS, 2010).

As características da qPCR possibilitam a eliminação da etapa de preparo do gel para eletroforese, convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional incluem, rapidez na obtenção dos resultados e capacidade quantitativa (CAVALCANTI, 2008).

Em geral, a qPCR também se mostra mais sensível que a técnica de PCR no diagnóstico e monitoração da infecção canina (FRANCINO et al., 2006).

### 3. Referências

ALBUQUERQUE, A.R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 78-80, 2007.

ALMEIDA, A.B.P.F. **Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p. 1-88, 2004.

ALVES, A.W.; BEVILAQUA, 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**, v.20, p. 259-265, 2004.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 66, p. 1933-1938, 2000.

AZEVEDO, M.A. et al. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréu, estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 123-127, 2008.

BADARÓ, R. et al. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal Infectious Diseases**, v. 173, p. 758-761, 1996.

BANETH G. **Leishmaniases**. In: Greene CE. (eds). Infectious Diseases of the dog and cat. 3<sup>th</sup> edition. Saunders Elsevier: Saint Louis, 685-698, 2006.

BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 481-487, 2004.

BAVIA, M.E. et al. Remote sensing and geographic information system and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brasil. **Parassitologia**, v. 47, p. 165-169, 2005.

BIAZZONO, L. **Avaliação da Reação de hipersensibilidade tardia a leishmania e das subclasses de imunoglobulinas Ig1 e Ig2 em cães de região endêmica para leishmaniose visceral**. São Paulo, 2003. 102p. Dissertação (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2003.

CAMARGO, J.B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 86-92, 2007.

CARVALHO, M.R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata Norte de Pernambuco**. Recife, 2005. (Dissertação de Mestrado - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ).

CAVALCANTI, M.P. **Development and evaluation of system based on real-time PCR for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2008.

CAVALCANTI, M.P. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, v. 58, p. 36-42, 2005.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with *L. infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. 1291-1301, 2011.



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

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Veterinary Parasitology**, v.136, p. 379-380, 2006.

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

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p.149–212, 1962.

DRUMOND, K.O.; COSTA, F.A.L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, p. 3-11, 2011.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36-42, 2000.

FEITOSA, M.M. **Leishmaniose visceral: um desafio crescente**. Boletim informativo – INTERVET PET, 2002, 15 p.

FELIPE, I.M.A. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 207-211, 2011.

FERRER, L. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. In: **PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM**, 2002, Sevilla. Anais... Espanha: 2002. p. 07-14.

FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161–173, 2003.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 617-623, 1996.

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

GRADONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: **PROCEEDINGS INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS**, 1999, Barcelona. Anais... Espanha, 1999. p. 32-39.

GRADONI, L., GRAMICCIA, M. **Leishmaniosis**. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), vol. 1, 6th ed. Office International des Epizooties, Paris, pp.240–250, 2008.

GUERRA, J.A.O. et al. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicos epidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 305-311, 2004.

HU, X. et al. Pilot production of u-PA with porous microcarrier cell culture. **Cytotechnology**, v. 33, p. 13-9, 2000.

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

KOUTINAS, A.F. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 247-261, 2001.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 907-910, 2007.

LACHAUD, L. et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 613–617, 2001.

LANGONI, H. et al. Epidemiological vigilance for canine Leishmaniasis in the country of Botucatu, SP, Brazil. **Ars Veterinária**, v.17, p.196-200, 2006.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, p. 13-23, 2009.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2005.

LITTLE, S.E. **Protozoal Diseases. Leishmaniasis**. In GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3th ed. St. Louis: Saunders, 2006. p. 685-698.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, p. 1-9, 1996.

MARCONDES, C.B. et al. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v, 36, p. 499-501, 2003.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-357, 1985.

MICHALSKY, E.M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MISSAWA, N.A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, É.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 399-405, 2002.

NUNES, V.L.B. et al. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 301-302, 2001.

OLIVA, A. et al. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

OSHAGHI, M.A. et al. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum* / *L. donovani* discrimination. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 61–65, 2009.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 1, p. 1184-1191, 2010.

PENA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 35-41, 2000.

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

REITHINGER, R. et al. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 748–751, 2000.

ROSYPAL, A.C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 970-972, 2005.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, C.S.O. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, p. 24-28, 1997.

SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K 39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SHERLOCK, I.A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.

SILVA, E.S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 285-291, 2001.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2008.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 1-16, 1988.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 951-958, 2000.

TASCA, K.I. et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 27-33, 2009.

VASCONCELOS, D.R.B. Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* por meio de qPCR em tempo real: triagem de genes e métodos

**quantitativos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2010.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, v. 4, p.337-348, 2004.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Geral**

Avaliar a Reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) na detecção e quantificação de *L. infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas;

### **4.2. Específicos**

Avaliar a Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de *L. infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas;

Avaliar a PCR em tempo real (qPCR) na detecção de *L. infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas;

Quantificar a carga parasitária de *L. infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) em diferentes amostras biológicas de cães sorologicamente positivos;

Quantificar a carga parasitária de *L. infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) na pele cães parasitologicamente positivos;

## **CAPÍTULO 1**

**Reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Leishmania infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas**



## **Reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Leishmania infantum* em cães utilizando diferentes amostras biológicas**

*Polimerase Chain Reaction and Real Time PCR for diagnosis of infection in dogs by *Leishmania infantum* using different biological samples*

### **RESUMO**

A importância do cão como reservatório de *Leishmania infantum* no meio urbano tem estimulado a realização de inúmeros trabalhos de avaliação de técnicas de diagnóstico, uma vez que este procedimento, quando realizado corretamente, torna-se um importante passo na prevenção da doença em humanos. Dentre os métodos de diagnóstico, as técnicas moleculares têm adquirido destaque. Objetivou-se neste trabalho verificar o desempenho da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) utilizando diferentes amostras biológicas. Para tanto foram utilizados 35 cães (positivo RIFI  $\geq 40$ ) provenientes de uma área endêmica para LVC, quais foram utilizados para o diagnóstico molecular (PCR e qPCR), aspirado de medula óssea, fragmentos de linfonodo e baço. Neste estudo a qPCR foi capaz de detectar um maior número de animais positivos quando comparada com a PCR. Já entre as diferentes amostras biológicas utilizadas não foi observada diferença significativa na detecção de DNA de *L. infantum* por meio da PCR e qPCR.

**Palavras-chave:** leishmaniose, diagnóstico, molecular

### **ABSTRACT**

The importance of dogs as reservoir for *Leishmania infantum* in the urban environment has stimulated numerous studies on the assessment of diagnostic techniques. When performed properly, this procedure is an important step in the prevention of the disease in humans. Molecular methods have become prominent for this purpose. The aim of the present study was to determine the performance of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) using different biological samples. For such, 35

dogs (positive IFAT  $\geq 40$ ) from an endemic area for CVL were used, with bone marrow aspirate and lymph node and spleen fragments used for the molecular diagnosis (PCR and qPCR). In the present study, qPCR was able to detect a greater number of positive animals in comparison to PCR. No significant differences between biological samples were found in the detection of *L. infantum* DNA using PCR or qPCR.

**Key-words:** leishmaniasis, diagnosis, molecular

## 1. Introdução

O diagnóstico correto e preciso da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é considerado um desafio constante na rotina da medicina veterinária. Na dependência da fase da doença e das condições imunológicas, os animais infectados podem apresentar-se assintomáticos (TASCA et al., 2009) o que dificulta a realização do diagnóstico.

Sabe-se que o método mais seguro de confirmação da LVC é a identificação do parasito em tecidos do hospedeiro por meio das técnicas parasitológicas (BARROUIN-MELO et al., 2004), no entanto, há limitações como baixa sensibilidade (PIARROUX et al., 1994).

No Brasil, área considerada endêmica para LVC, o diagnóstico desta enfermidade ainda é, muitas vezes, realizado por meio de testes sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), embora existam relatos de reações cruzadas com outros agentes (LIRA, 2005).

Outras técnicas como a cultura do parasito e o xenodiagnóstico também podem ser realizadas, entretanto a primeira trata-se de um método laborioso, demorado e também com baixa sensibilidade (PIARROUX et al., 1994), a segunda, por sua vez, é pouco utilizada na rotina de diagnóstico.

Em virtude das limitações apresentadas por algumas técnicas, outras metodologias são avaliadas como promissoras para o diagnóstico da infecção em cães. Desta forma, a PCR surgiu como uma importante ferramenta de diagnóstico (HU et al., 2000; LEONTIDES et al., 2002; OSHAGUI et al., 2009), assim como suas

derivações como a qPCR que vem sendo utilizada uma vez que também possibilita a realização de estudos relacionados à carga parasitária (ROLÃO et al., 2004; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004; FRANCINO et al., 2006).

A alta sensibilidade e especificidade em detectar o protozoário tem tornado as técnicas moleculares importantes para o diagnóstico preciso da infecção por *L. infantum*. Além disso, são metodologias rápidas e práticas podendo ser aplicadas a diferentes amostras biológicas (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

Desta forma, objetivou-se neste estudo avaliar a PCR e qPCR no diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães provenientes de área endêmica utilizando diferentes amostras biológicas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Aspecto ético**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) obtendo parecer favorável (nº P. 23082.015004/2011).

### **2.2. Local e animais**

Os animais (n = 35) utilizados no estudo foram capturados e conduzidos ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Petrolina, Pernambuco, por se apresentarem sororreagentes a anticorpos anti-*L. infantum* (positivo RIFI  $\geq$  40).

Os animais foram submetidos a exame clínico, onde os sinais observados foram documentados em uma ficha clínica (Anexo). De acordo com os sinais clínicos os animais foram separados em três grupos: assintomático (A) sem apresentar sinal clínico oligossintomático (O) com um a três sinais clínicos e polissintomático (P) com mais de três sinais clínicos (MANCIANTI et al., 1988).

Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia pelo referido CCZ, em cumprimento ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de Leishmaniose Visceral devem ser submetidos à eutanásia, seguindo as recomendações da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia de animais.

### 2.3. Amostras biológicas

Foi realizada biópsia de medula óssea diretamente do manúbrio do osso esterno. Em seguida, após a eutanásia, foram coletados fragmentos de baço e linfonodo.

### 2.4. Diagnóstico molecular

#### 2.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o Kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação foi realizada em reações de 25µl contendo 2,5µL de Tampão 20mM Tris-HCl (pH8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM (cada) desoxinucleosídeo trifosfatado, 1,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10pmol (cada) primer e 100ng de DNA genômico. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo 94°C – 2 min, e 30 ciclos 94°C – 20 seg, 60 °C – 20 seg, 72°C – 30 seg, seguidos de uma extensão final 72°C – 5 min .

Os *primers* utilizados (MC1 e MC2) foram descritos por Cortes et al. (2004): MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3'). A utilização destes *primers* permitem a amplificação de um fragmento de 447 pares de base (pb) do kDNA (DNA do cinetoplasto) da *L. infantum*.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Posteriormente, os géis foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador ultravioleta acoplado a um computador com *software* de análise de imagens.

#### 2.4.3. PCR em tempo real

A reação para detecção de kDNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda (FAM- 5'-AAAATGGGTGCAGAAAT-3' MGB) descritos por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5µl) continha 6,25µl de Taqman® Universal PCR Master Mix, 900nM de cada *primers*, 200nM de sonda e 50ng de DNA genômico.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma etapa inicial de 95°C por 10 min, seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg).

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e controle positivo (DNA proveniente de cultura *in vitro* de *L. infantum*).

## **2.5. Análise dos dados**

As diferenças entre as frequências de resultados positivos foram avaliadas pelo teste exato de Fischer e Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

## **3. Resultados**

### **3.1. Avaliação clínica**

Dos animais estudados, 14,28% (5/35) foram classificados como assintomáticos (A), 68,57% (24/35) oligossintomáticos (O) e 17,14% (6/35) como polissintomáticos (P) para LVC. De acordo com as avaliações realizadas, os sinais clínicos mais presentes foram dermatopatias, caquexia e grifose.

### **3.2. PCR e qPCR**

De todas as amostras avaliadas na PCR, foi detectada a presença de DNA de *L. infantum* em 40% (14/35) dos animais em pelo menos uma das amostras examinadas. Desses animais, 42,85% (6/14) foram positivos em apenas um tecido e 57,15% (8/14) foram positivos nos três tecidos analisados.

O produto amplificado na PCR foi um fragmento de 447 pb, não sendo observada em nenhuma das amostras consideradas controle negativo.

Das amostras testadas na qPCR foi detectada a presença de DNA de *L. infantum* em 100% dos animais em pelo menos uma das amostras (medula óssea, linfonodo e/ou baço). Desses animais, 2,85% (1/35) foi positivo em apenas uma das amostras, 2,85% (1/35) foi positivo em apenas duas das amostras e 94,3 % (33/35) foram positivos nas três amostras analisadas.

Os resultados obtidos após a realização do diagnóstico molecular em cada amostra biológica estão contidos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados da PCR e qPCR em diferentes amostras biológicas de animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.

Grupo Clínico	Número animais	PCR (%)			qPCR (%)		
		Medula	Baço	Linfonodo	Medula	Baço	Linfonodo
A	5	0 (00,0)	0 (00,0)	1 (20,0)	5 (100,0)	5 (100,0)	5 (100,0)
O	24	5 (20,8)	6 (25,0)	6 (25,0)	24 (100,0)	23 (95,8)	23 (95,8)
P	6	4 (66,6)	4 (66,6)	4 (66,6)	5 (83,3)	6 (100,0)	6 (100,0)

(P>0,05)

A= assintomático; O= oligossintomático; P= polissintomático

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tecidos analisados com relação a cada grupo clínico (P>0,05).

Os resultados obtidos considerando a positividade nos dois testes realizados (PCR e qPCR) estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados da PCR e qPCR em animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.

Grupo clinico	Número de animais	PCR	qPCR
A	5	1	5
O	24	8	24
P	6	4	6

(P>0,05)

A= assintomático; O= oligossintomático; P= polissintomático

A qPCR apresentou uma frequência de resultados positivos significativamente superior a PCR (P>0,05).

#### 4. Discussão

Os sinais clínicos observados nos animais em estudo foram compatíveis com as alterações descritas nos casos da infecção canina (ALBUQUERQUE et al., 2007) Sendo os sinais clínicos mais frequentemente observados: dermatopatias, caquexia e grifose.

Em se tratando do diagnóstico molecular, inúmeras amostras biológicas têm sido utilizadas. Neste estudo foram utilizados medula óssea e fragmentos de linfonodo e baço de animais submetidos à eutanásia. No entanto, o procedimento de coleta destas amostras nos animais vivos também é realizado, podendo ser facilmente realizado na rotina veterinária, principalmente medula óssea e linfonodo.

Um dos entraves para a utilização do aspirado de baço neste tipo de diagnóstico está relacionado a sua coleta, onde muitos profissionais temem a ocorrência de hemorragias (LÉVEILLÉ et al., 1993), entretanto, estes riscos são consideravelmente minimizados quando realizados com auxílio da ultrassonografia (WATSON et al., 2010).

Sabe-se que a sensibilidade por meio da PCR pode variar amplamente de acordo com o tempo de infecção. Acredita-se que inicialmente a sensibilidade será zero, cerca de 135 dias após a infecção poderá atingir maiores sensibilidades (78 a 88%) (QUINNEL e COURTENAY, 2009). Além disso, a carga parasitária apresentada pelos animais influencia a sensibilidade desta técnica que, embora seja capaz de detectar pequenas quantidades de DNA pode apresentar limitações.

Entre as diferentes amostras biológicas analisadas por meio da PCR, aquela proveniente do linfonodo apresentou-se como a melhor opção para detecção de DNA do protozoário, detectando animais positivos nos três grupos clínicos (A, O, P).

De acordo com Ikonomopoulos et al. (2003) o linfonodo é considerado o órgão de eleição para realização do diagnóstico molecular de *L. infantum* por meio da PCR. Por outro lado, utilizando medula óssea e baço foram detectados animais positivos apenas nos grupos O e P. A diferença nos resultados verificados podem estar relacionadas à distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, a carga parasitária e a resposta imune local (MAIA et al., 2009).

Em virtude de algumas limitações apresentadas pela PCR, a qPCR vem sendo considerada uma ferramenta cada vez mais útil na detecção e quantificação deste protozoário (ROLÃO et al., 2004).

Neste estudo, a qPCR foi capaz de detectar a presença de DNA de *L. infantum* em todos os animais estudados. Analisando as diferentes amostras verificaram-se altos índices de positividade com a frequência relativa variando de 83,3 a 100% nos diferentes grupos clínicos.

Dentre estas amostras, aquelas provenientes do baço e do linfonodo apresentaram positividade de 95,8% no grupo O e 100% nos grupos A e P. Considerando-se a facilidade de obtenção destas duas amostras biológicas o linfonodo, mais uma vez, apresenta-se como o órgão mais viável para detecção de DNA de *L. infantum* em cães.

Neste caso, verifica-se a importância da utilização da qPCR que se mostra um método confiável para detecção de DNA de *L. infantum* independentemente do estado clínico do animal, em contraste com outros métodos como, por exemplo, os parasitológicos e sorológicos onde os índices de positividade são maiores em animais sintomáticos (QUARESMA et al., 2009). Considera-se que o diagnóstico nos animais assintomáticos é muito importante, uma vez que eles também desempenham o papel de reservatório da *L. infantum* (DANTAS-TORRES, 2006).

Inúmeros são os relatos da alta sensibilidade da qPCR em relação à PCR (FRANCINO et al., 2006) no entanto, nem sempre esta relação é observada, podendo variar na dependência dos *primers* utilizados, assim como na sequência de DNA a ser amplificada (BASTIEN et al., 2008).

Neste contexto, a sensibilidade obtida pode estar relacionada ao DNA alvo amplificado, uma vez que a detecção de kDNA (cinetoplasto DNA) é normalmente mais sensível por estar presente em um grande número de cópias por parasito (LACHAUD et al., 2002) quando comparados com outras sequências alvo como por exemplo rDNA (ribossomal DNA).

Estudos relacionados a avaliações de técnicas para diagnóstico da LVC são sempre necessários, tendo em vista a busca da melhor forma de identificar esta



infecção em cães provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas. Particularmente no caso da LVC, o seu controle está relacionado à utilização de testes de diagnóstico que apresentem resultados seguros, de maneira que, os cães positivos não deixem de serem removidos o que contribui para a não propagação da doença (BRASIL, 2003).

Baseado nos dados aqui obtidos, fica clara a importância da utilização de técnicas moleculares notadamente a qPCR no diagnóstico da LVC detectando cães positivos independentemente do estado clínico do animal.

## 5. Conclusões

Neste estudo a qPCR apresenta-se como uma melhor ferramenta de diagnóstico quando comparada com a PCR na detecção da infecção por *L. infantum*.

Dentre as amostras biológicas analisadas, o linfonodo apresenta-se como a mais apropriada para detecção de *L. infantum* por meio da PCR e qPCR, por ser capaz de detectar animais positivos independentemente do seu estado clínico. Além disso, considerando a facilidade de obtenção, sugere-se esta amostra (linfonodo) como a mais viável para diagnóstico molecular desta infecção em cães.

## 6. Referências

ALBUQUERQUE, A.R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v. 71, p. 78-80, 2007.

BARROUIN-MELO, S.M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 1, p. 331-339, 2004.

BASTIEN, P.; PROCOP, G.W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 1897-1890, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2003.

CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v. 98, p. 12-17, 2004.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Phlebotomidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Veterinary Parasitology**, v.136, p. 379-380, 2006.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

HU, X. et al. Pilot production of u-PA with porous microcarrier cell culture. **Cytotechnology**, v. 33, p. 13-9, 2000.

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

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210-215, 2002.

LEONTIDES, L.S. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19-27. 2002.

LÉVEILLÉ, R. et al. Complications after ultrasound-guided biopsy of abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984-1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 203, p. 413-415, 1993.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2005.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 142-144, 2009.

MANCIANTI, F. et al., Studies on canine leishmaniasis control 1: Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antomomial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v 82, p. 566-567, 1988.

OSHAGHI, M.A. et al. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 61–65, 2009.

PIARROUX, R. et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 746-749, 1994.

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**, v.111, p. 289- 294, 2009.

QUINNEL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

ROLÃO, N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v.90, p. 1150-1154, 2004.

TASCA, K.I. et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 27-33, 2009.

VITALE, F. et al. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Academy of Sciences**, v. 1026, p.139-143, 2004.

WATSON, A.T. et al. Safety and correlation of test results of combined ultrasound-guided fine-needle aspiration and needle core biopsy of the canine spleen. **Veterinary Radiology Ultrasound**, v. 52, p. 317-322, 2010.

WORTMANN, G.W. et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 148-151, 2004.

## **CAPÍTULO 2**

**Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) em diferentes amostras biológicas**

## **Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) em diferentes amostras biológicas**

*Quantification of Leishmania infantum DNA by real-time polymerase chain reaction (qPCR) using different biological samples*

### **RESUMO**

Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma importante zoonose parasitária endêmica no Brasil causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. O diagnóstico da infecção tem sido realizado por meio de diferentes metodologias como as sorológicas, parasitológicas e moleculares. Considerando os métodos moleculares, a PCR em tempo real (qPCR) tem sido considerada uma importante ferramenta para o diagnóstico da infecção. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar DNA de *L. infantum* por meio da qPCR usando diferentes amostras biológicas. Para tanto, 24 cães (positivo RIFI  $\geq 40$ ) provenientes de uma área endêmica para LVC foram utilizados. Amostras de medula óssea, linfonodo e baço foram coletadas para quantificação da carga parasitária. Os resultados obtidos mostraram não haver diferença significativa entre a carga parasitária apresentada entre as diferentes amostras biológicas ( $P=0,345$ ). Por outro lado, entre os grupos clínicos foi verificada diferença significativa ( $P=0,012$ ). Os achados do presente estudo sugerem que a carga parasitária da medula óssea, linfonodo e baço é maior nos cães que apresentam um maior número de sinais clínicos (carga parasitária dos animais polissintomáticos > carga parasitária dos animais oligossintomáticos > carga parasitária dos animais assintomáticos).

**Palavras chave:** molecular, *Leishmania*, carga parasitária

### **ABSTRACT**

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is an important parasitic endemic zoonosis in Brazil, caused by the protozoa known as *Leishmania infantum*. Diagnosis of this infection has been realized using several different methodologies as serological, parasitological and molecular methods. Considering the molecular methods, the real time PCR (qPCR) has been considered an important tool for

diagnosis of CVL. Thus, the purpose of this study was to quantify the *L. infantum* DNA by qPCR using different biological samples. For such, 24 dogs (positive IFAT  $\geq 40$ ) from an endemic area for CVL were utilized. Samples of bone marrow, lymph node and spleen were collected by quantification of parasite load by qPCR. The results showed that there is not significant difference among distinct biological samples according to parasite load ( $P=0.345$ ). On the other hand, among the clinical group it was detected significant difference ( $P=0.012$ ). The findings of the present study suggests that the parasite load on bone marrow, lymph node and skin is greater among those dogs with more clinical signs (parasite load on polysymptomatic animals > parasite load on oligosymptomatic animals > parasite load on asymptomatic animals).

**Key-words:** molecular, *Leishmania*, parasite load

## 1. Introdução

Leishmaniose Visceral é uma importante zoonose parasitária de ocorrência mundial que apresenta grande importância médica veterinária uma vez que o cão é considerado o principal reservatório do parasito *L. infantum* no meio urbano (MARTÍNEZ et al., 2011).

Em virtude de sua importância, existe um grande interesse no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para detecção deste protozoário nos animais infectados, uma vez que o diagnóstico clínico é inconclusivo, considerando a grande variedade de sinais apresentados pelos animais.

Inúmeros ensaios baseados no princípio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* (MAURYA et al., 2005; STRAUSS-AYALI et al., 2004). No entanto, a sensibilidade destes ensaios tem se mostrado variável, por outro lado, eles não são capazes de quantificar a carga parasitária presente nos animais infectados (TUPEWARR et al., 2008).

Neste contexto, uma importante ferramenta tem surgido na tentativa de otimizar o diagnóstico molecular, a PCR em tempo real (qPCR). Esta técnica permite

a quantificação da carga parasitária em diferentes amostras biológicas (BELL e RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

Acredita-se que baço seja um dos órgãos que apresenta grande densidade parasitária tanto em cães sintomáticos quanto assintomáticos. Além disso, tem sido proposto, também, que este seja o principal local para multiplicação e acumulação do protozoário (MAIA et al., 2009). Outras amostras têm sido utilizadas também neste tipo de diagnóstico apresentando resultados variáveis. Desta forma, em virtude da utilização de linfonodo, baço e medula óssea em diversos estudos moleculares para detecção de *L. infantum* em cães, objetivou-se, neste trabalho, avaliar estas três amostras biológicas, quantificando sua carga parasitária em animais sorologicamente positivos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Aspecto ético**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) obtendo parecer favorável (nº P. 23082.015004/2011).

### **2.2. Local e animais**

Os animais (n = 24) utilizados no estudo foram capturados e conduzidos ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Petrolina, Pernambuco, por se apresentarem sororreagentes a anticorpos anti-*L. infantum* (positivo RIFI  $\geq$  40).

Os animais foram submetidos a exame clínico, onde os sinais observados foram documentados em uma ficha clínica (Anexo). De acordo com os sinais clínicos os animais foram separados em três grupos: assintomático (A) - sem apresentar sinal clínico, oligossintomático (O) - com um a três sinais clínicos e polissintomático (P) - com mais de três sinais clínicos (MANCIANTI et al., 1988).

Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia pelo referido CCZ, em cumprimento ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de Leishmaniose Visceral devem ser submetidos à eutanásia, seguindo as recomendações da



Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia de animais.

### **2.3. Amostras biológicas**

Antes dos animais serem submetidos a eutanásia foi realizada a biópsia de medula óssea diretamente do manúbrio do osso esterno. Após a eutanásia durante as necropsias foram coletados fragmentos de baço e linfonodo.

### **2.4. Diagnóstico molecular**

#### **2.4.1. Extração de DNA**

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **2.4.2. PCR em tempo real**

A reação para detecção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan-MGB probe (FAM- 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- non-fluorescent quencher-MGB) descritos por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5µl) continha 6,25µl de Taqman® Universal PCR Master Mix, cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 900nM, sonda na concentração de 200nM, e 1µl de DNA molde.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e positivo (DNA proveniente de cultura *in vitro* de *L. infantum*).

Parasitas foram quantificados pelo método de quantificação absoluta. Uma curva padrão foi construída com diluições de DNA de *L. infantum* provenientes de cultura contendo aproximadamente  $5,6 \times 10^6$  parasitos/mL. Considerando-se uma

eficiência de extração de 100%, oito diluições seriadas do estoque de DNA foram realizadas em água livre de nucleases. Quatro pontos foram utilizados para construção da curva (0,01, 1, 1.000 e 1.000.000 parasitos/mL).

Para normalização dos dados, os resultados obtidos foram transformados em  $\log_{10}$  adicionado da constante 1,5.

### 2.4.3. Análise dos dados

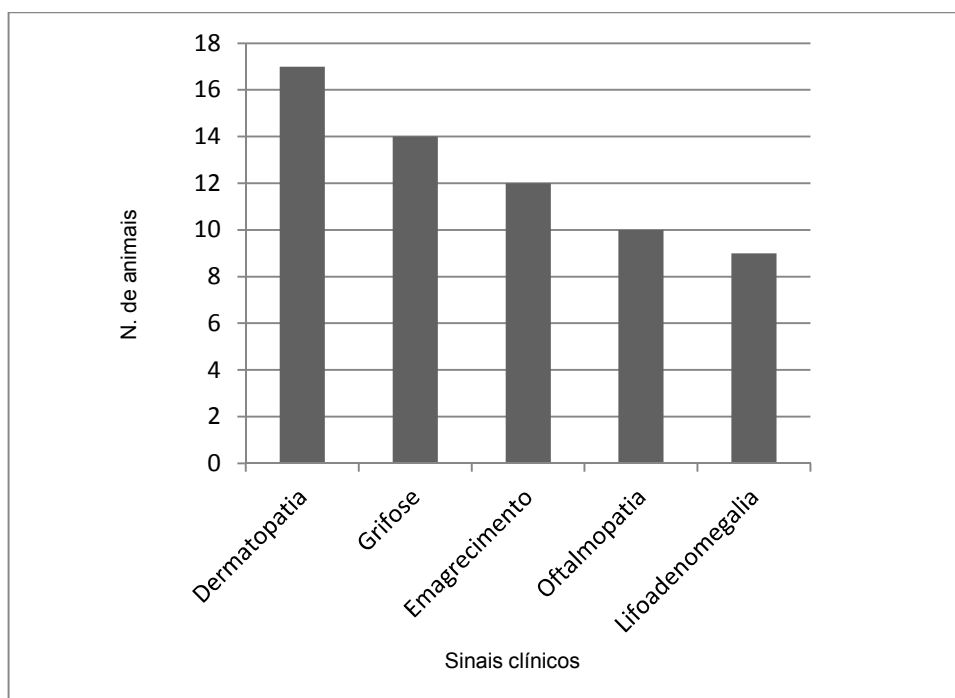
Os dados foram analisados estatisticamente por meio do Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) utilizando o programa MINITAB® Release 14.1.

## 3. Resultados

### 3.1. Avaliação clínica

Dos animais estudados 12,5% (3/24) foram classificados como Assintomáticos (A), 62,5% (15/24) Oligossintomáticos (O) e 25,0% (6/24) como Polissintomáticos (P) para LVC.

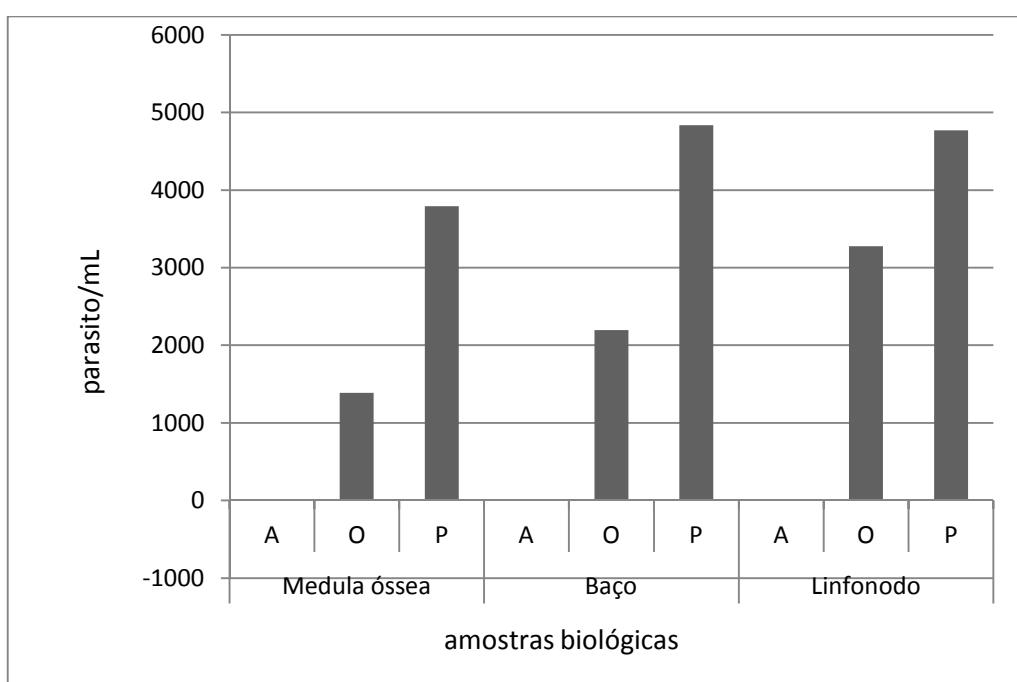
De acordo com as avaliações clínicas, os sinais clínicos mais frequentes estão descritos na Figura 1.



**Figura 1.** Sinais clínicos observados nos animais naturalmente infectados por *L. infantum*.

### 3.2. PCR em tempo real

Presença de DNA de *L. infantum* foi detectada em 100% dos animais em pelo menos uma das amostras testadas (medula óssea, linfonodo e/ou baço). Das amostras de medula óssea verificou-se que 8,3% (2/24) dos animais foram consideradas negativas, dentre estas pertencente ao grupo O e o outra ao grupo P. Por sua vez, nas amostras de baço e linfonodo 4,1% (1/24) dos animais foram considerados negativos, sendo ambos os casos pertencentes ao grupo O. O número de parasitos/ml expressos em log 10 podem ser vizibilizados na Figura 2.



**Figura 2.** Número de parasitos/mL expressos em log 10 de acordo com o grupo clínico.

Pela análise de variância não foi possível detectar diferença significativa entre os diferentes tecidos avaliados com relação à quantidade média de parasitos ( $P=0,345$ ). Por outro lado, entre os grupos clínicos foi possível detectar diferenças significativas ( $P=0,012$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quantidade média de parasitos/mL em cães de diferentes grupos clínicos.

Grupo clínico	Média (original)	Média transformada
A	8.622	1.055 a
O	22.258,183	2.850 a
P	58.027,752	4.770 b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P=0,012) ANOVA fatorial / Teste de Tukey

A= assintomático, O=oligossintomático, P= polissintomático

#### 4. Discussão

Os sinais clínicos verificados nos animais em estudo são compatíveis com outros sinais descritos nos relatos da infecção canina (SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Neste estudo, a qPCR foi capaz de detectar a presença de DNA de *L. infantum* em todos os animais estudados, sem entretanto, apresentar diferenças significativas entre cargas parasitárias nas amostras de linfonodo, baço e medula óssea.

Embora Maia et al. (2009) sugerem distribuição heterogênea dos parasitos em cada órgão, escassos são os trabalhos onde a carga parasitária é quantificada, sendo informações dessa natureza extremamente relevantes para escolha do material a ser utilizado para o diagnóstico da infecção por *L. infantum*. Anteriores estudos de comparações de técnicas sugerem o linfonodo como o órgão de eleição para o diagnóstico molecular (IKONOMOPOULOS et al., 2003; RAMOS et al., 2012).

Por outro lado, diferença foi observada na carga parasitária quando analisados os diferentes grupos clínicos (P=0,012). Os dados obtidos indicam que os sinais clínicos observados nos animais estão relacionados com carga parasitária apresentada pelos cães infectados. Estudo similar, quantificando a carga parasitária em linfonodos verificou uma maior quantidade de *Leishmania* sp. nos animais sintomáticos quando comparados com os assintomáticos (MANNA et al., 2009).

Os dados aqui obtidos, não descartam a importância dos animais pertencentes aos grupos assintomáticos e oligossintomático como reservatório de *L.*

*infantum*, uma vez que, mesmo em menor quantidade, também foi detectada a presença deste protozoário nos diferentes órgãos destes animais.

Estes resultados, aliados a estudos anteriores (RAMOS et al., 2012), sugere-se o linfonodo como a amostra de eleição para o diagnóstico molecular. Uma vez que é uma amostra de fácil obtenção, apresentando uma grande carga parasitária, notadamente nos animais polissintomáticos.

## 5. Conclusão

Os achados aqui descritos indicam que a carga parasitária apresentada pelos cães infectados por *L. infantum* aumenta a medida que se evidenciam os sinais clínicos expressos por estes animais (carga parasitária dos animais polissintomáticos > carga parasitária dos animais oligossintomáticos > carga parasitária dos animais assintomáticos).

## 6. Referências

BELL, A.S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 337-342, 2002.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

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

MANCIANTI, F. et al., Studies on canine leishmaniasis control 1: Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antomonal treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v 82, p. 566-567, 1988.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 142-144, 2009.

MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 76-78, 2009.

MARTÍNEZ, V. et al. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 57, 2011.

MAURYA, R. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3038–3041, 2005.

RAMOS, R.A.N. et al. Evaluation of the Polimerase Chain Reaction and Real Time PCR for diagnosis of infection in dogs by *Leishmania infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. xx, p. xx, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 7-12, 2004.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infection Disease**, v. 189, p. 1729–1733, 2004.

TUPEWARR, N. et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. **Parasitology**, v. 61, p. 23-30, 2008.

## **CAPÍTULO 3**

**Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* por meio da PCR em tempo real em pele de cães naturalmente infectados**

## Quantificação de DNA de *Leishmania infantum* por meio da PCR em tempo real em pele de cães naturalmente infectados

*Quantification of Leishmania infantum DNA in skin of naturally infected dogs using real-time polymerase chain reaction*

### RESUMO

Os cães são importantes reservatórios de *Leishmania infantum* em virtude do intenso parasitismo cutâneo que apresentam. Sabendo-se que muitos animais infectados podem permanecer assintomáticos albergando o parasito na pele, o presente trabalho teve como objetivo quantificar a carga parasitária apresentada na pele de cães com diagnóstico parasitológico positivo para *L. infantum* relacionando-a ao estado clínico do animal. Para realização do estudo foi realizada qPCR de amostras de pele de 15 animais (parasitológico de medula óssea positivo). Parasitos foram quantificados pelo método de quantificação absoluta. A quantidade média de parasitos no grupo assintomático foi de 0,23 parasito/mL, seguida do oligossintomático com 16.518,04 parasito/mL e por fim os polissintomáticos com 1.326.391,2 parasito/mL. Os resultados permitem concluir que a carga parasitária aumenta a medida que os sinais clínicos se tornam mais evidentes, ou seja os animais polissintomáticos apresentam uma maior densidade parasitária na pele, quando comparados com os oligossintomáticos e assintomáticos.

**Palavras chave:** molecular, carga parasitária, pele

### ABSTRACT

Dogs are important reservoirs of *Leishmania infantum* due to intensive cutaneous parasitism. Considering that many infected animals remain asymptomatic, but with a large parasitism in skin, the aim of the present study was to quantify the parasite load in the skin of dogs naturally infected by *L. infantum* and relate the findings to clinical status. Skin samples from 15 dogs (bone marrow positive) were utilized in the present study. Parasites were quantified by absolute counts. The mean number of parasites was 0.23/mL in the asymptomatic group, 16,518.04/mL in the oligosymptomatic group and 1,326,391.2/mL in the polysymptomatic group. The



results demonstrate that clinical signs of infection become more evident as the parasite load increases, as polysymptomatic animals exhibit a greater parasite density on the skin in comparison to oligosymptomatic and asymptomatic animals.

**Key-words:** molecular, parasite load, skin

## **1. Introdução**

A urbanização da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil atribuiu ao cão doméstico um importante papel na epidemiologia desta enfermidade, tornando-o principal reservatório da *L. infantum* no meio urbano. Uma das características que tornam estes animais importantes reservatórios do protozoário é o seu intenso parasitismo cutâneo (QUEIROZ et al., 2010). Sendo a pele considerada a primeira barreira biológica de proteção, onde ocorre a primeira interação parasito x hospedeiro (KOUTINAS et al., 1999).

Estudos indicam que a pele saudável dos animais infectados com *L. infantum* é mais atrativa para o inseto vetor (GUARDA et al., 2000). Consequentemente, os animais assintomáticos desempenham um importante papel na epidemiologia da doença, uma vez que podem permanecer por anos sem apresentarem sinais clínicos (MORENO e ALVAR, 2002).

Com base nos dados de parasitismo cutâneo apresentados pelos cães infectados por *L. infantum* e sua importância como reservatório do agente em áreas urbanas, objetivou-se neste trabalho realizar a quantificação de DNA de *L. infantum* por meio da PCR em tempo real (qPCR) na pele de cães naturalmente infectados relacionando-a com os sinais clínicos apresentados pelos animais.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Aspecto ético**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) obtendo parecer favorável (nº P. 23082.015004/2011).

## **2.2. Local e animais**

Os animais (n = 15) utilizados no estudo foram capturados e conduzidos ao Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina por se apresentarem naturalmente infectados para LVC (positivo RIFI  $\geq 40$ , confirmado pelo parasitológico de medula óssea).

Esses cães foram submetidos à eutanásia pelo CCZ, em cumprimento ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de Leishmaniose Visceral devem ser submetidos à eutanásia. Para este procedimento os cães foram anestesiados com pentobarbital sódico (15 mg/kg/iv) e ainda em plano anestésico, aplicou-se uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%, por via intravenosa, seguindo as recomendações da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia de animais.

Anteriormente à eutanásia, os animais foram submetidos a exame clínico, onde os sinais observados foram documentados em uma ficha clínica (Anexo). De acordo com os sinais clínicos da LVC foram separados em dois grupos: Assintomático (A) sem apresentar sinal clínico, Oligossintomático (O) com um a três sinais clínicos e Polissintomático (P) com mais de três sinais clínicos (MANCIANTI et al., 1988).

## **2.3. Amostras biológicas**

Foi realizada a biópsia de pele de um fragmento de 0,3 cm x 0,3 cm de cada animal. Este material foi acondicionado em tubos estéreis e congelados a - 20°C para posterior processamento.

## **2.4. Diagnóstico molecular**

### **2.4.1. Extração de DNA**

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 2.4.2. PCR em tempo real

A reação para detecção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan-MGB probe (FAM- 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- non-fluorescent quencher-MGB) utilizados por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5µl) continha 6,25µl de Taqman® Universal PCR Master Mix, cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 900 nM, sonda na concentração de 200nM, e 1µl de DNA molde.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e positivo (DNA proveniente de cultura *in vitro* de *L. infantum*).

Parasitas foram quantificados pelo método de quantificação absoluta. Uma curva padrão foi construída com diluições de DNA de *L. infantum* provenientes de cultura *in vitro* contendo aproximadamente  $5,6 \times 10^6$  parasito/mL. Considerando-se uma eficiência de extração de 100%, oito diluições seriadas do estoque de DNA foram realizadas em água livre de nucleases. Quatro pontos foram utilizados para construção da curva (0,01, 1, 1.000 e 1.000.000 parasitos/mL).

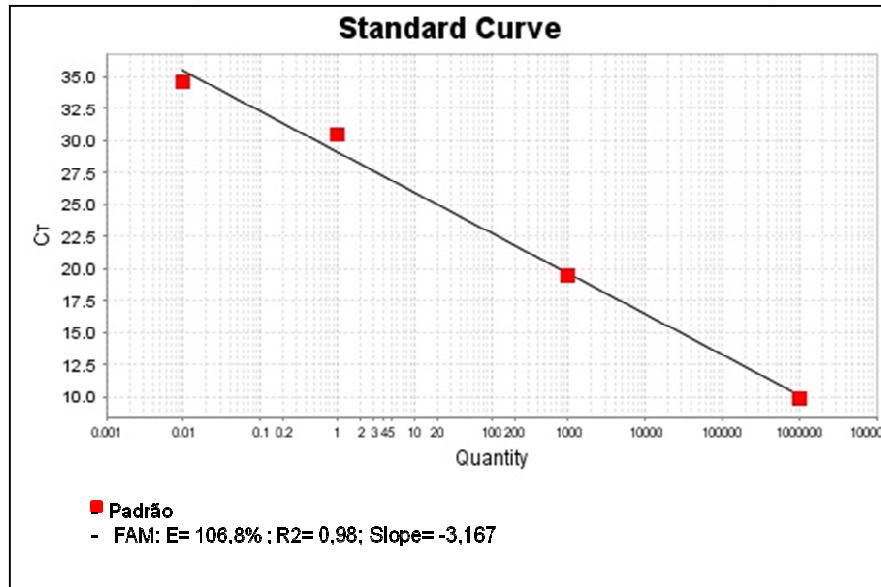
Para normalização dos dados os resultados obtidos foram transformados em  $\log_{10}$  adicionado da constante 1,5.

#### 2.5. Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

A curva padrão obtida pode ser visualizada na Figura 1.



**Figura 1.** Curva padrão construída a partir de diferentes diluições de DNA de *L. infantum* expressas em número de parasitos/mL

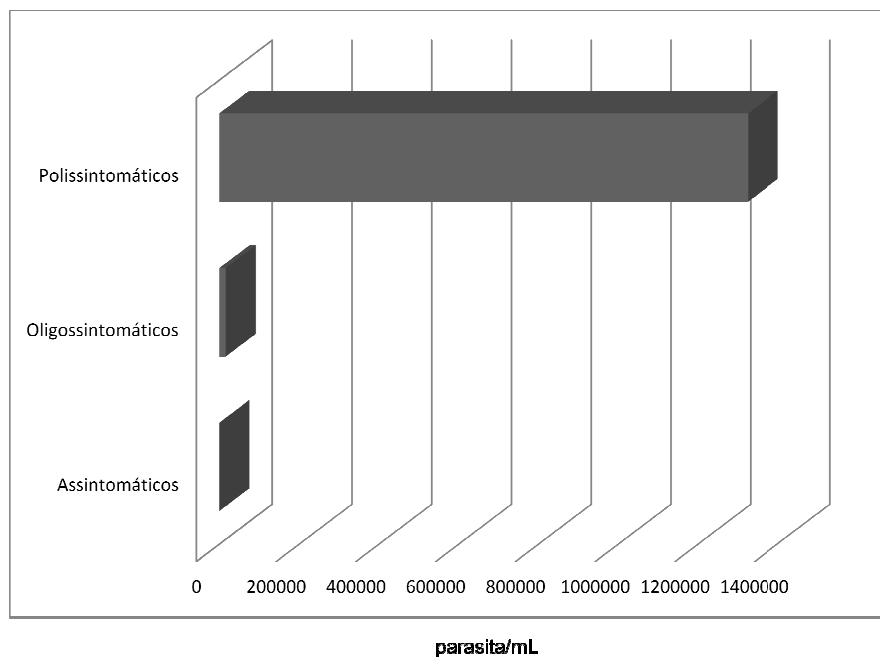
De acordo com os sinais clínicos apresentados pelos animais estudados 13,3% (2/15) foram classificados como assintomáticos (A), 53,3% (8/15) oligossintomáticos (O) e 33,3% (5/15) como polissintomáticos (P) para LVC.

O número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra (Ct médio), desvio padrão, média de parasito/mL e classificação clínica dos animais positivos na qPCR estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Ciclo de threshold (Ct) médio, desvio padrão, média de parasito/mL e classificação clínica dos animais positivos.

<b>Animal</b>	<b>Ct médio e desvio padrão</b>	<b>Média parasito/mL</b>	<b>Classificação clínica</b>
01	27,326 ± 0,011	3,748	Oligossintomático
03	30,964 ± 0,045	0,266	Assintomático
05	26,549 ± 0,139	6,615	Oligossintomático
06	28,714 ± 0,914	1,574	Oligossintomático
07	31,443 ± 0,418	0,194	Assintomático
08	28,272 ± 0,336	1,922	Oligossintomático
09	12,543 ± 0,022	174.579,703	Polissintomático
10	7,898 ± 0,041	5.106.553,5	Polissintomático
11	5,767 ± 0,141	24.117,096	Polissintomático
13	21,233 ± 0,036	314,533	Polissintomático
14	4,441 ± 0,668	66.815,896	Oligossintomático
15	5,41 ± 0,435	32.278,544	Oligossintomático

A quantidade média de parasitos nos grupos A, O e P foi 0,23, 16.518,04, e 1.326.391,2 parasito/mL respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Quantidade média de parasitas nos animais positivos na qPCR de acordo com o grupo clínico.

Os resultados obtidos demonstram uma alta densidade parasitária na pele dos cães polissintomáticos sendo muito superior a carga parasitária apresentada pelos oligossintomáticos que por sua vez é superior aos assintomáticos. No entanto, diferença significativa é observada apenas entre os grupos A e P.

#### 4. Discussão

Os resultados obtidos assemelham-se aos encontrados por Manna et al. (2009) que detectaram uma maior quantidade de DNA de *L. infantum* em linfonodo de cães à medida que aumentavam o número de sinais clínicos.

Os dados aqui descritos não descartam a importância do cão assintomático como reservatório de *L. infantum*, uma vez que mesmo em menor quantidade foi detectada a presença deste protozoário na pele dos animais.

A presença destes cães infectados assintomáticos no meio urbano constitui um sério risco a Saúde Pública, considerando principalmente três aspectos: 1. a pele saudável dos animais assintomáticos são mais atrativas para os flebotomíneos (GUARDA et al., 2000); 2. pêlos de cães infectados exalam compostos (2-hexanona, benzaldeído e hexanal) que os tornam mais atrativos para a atividade do *L.*

*longipalpis* (DOUGHERTY et al., 1999); 3. o protozoário está presente nos animais infectados tanto na pele íntegra quanto lesionada (QUEIROZ et al., 2011). Ambos os aspectos contribuem para infecção dos insetos vetores, facilitando a dispersão da doença tanto nos cães como nos humanos.

Considerando os resultados dos grupos O e P o trabalho suporta dados já descritos onde se verifica que a medida que os sinais clínicos tornam-se mais evidentes há um aumento na carga parasitária apresentada na pele dos animais infectados. Este estudo reforça a importância do cão doméstico como importante reservatório de *L. infantum* no meio urbano, notadamente em áreas endêmicas.

## 5. Conclusões

Baseado nos dados aqui obtidos conclui-se que a carga parasitária apresentada na pele dos animais infectados é maior nos animais com sinais clínicos aparente (carga parasitária dos animais polissintomáticos > carga parasitária dos animais oligossintomáticos > carga parasitária dos animais assintomáticos).

## 6. Referências

DOUGHERTY, M. J. et al. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. **Physiological Entomology**. v.24, p.251-262, 1999.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GUARDA, J. et al. Naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Acta Tropica**, v. 77, p. 203–207.

KOUTINAS, A.F. et al. Clinical Considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). **Journal American Animal Hospital Association** v. 35, p. 376–383, 1999.

MANCIANTI, F. et al., Studies on canine leishmaniasis control 1: Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antomomial

treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene**, v 82, p. 566-567, 1988.

MANNA, L. et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 76-78, 2009.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 399-405, 2002.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 34–40, 2010.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 31, p. 1-8, 2011.



## 7. Considerações finais

- A qPCR apresenta-se como uma melhor ferramenta de diagnóstico quando comparada com a PCR na detecção da infecção por *L. infantum*.
- O linfonodo apresenta-se como a mais apropriada para detecção de *L. infantum* por meio da PCR e qPCR, sendo capaz de detectar animais positivos independentemente do seu estado clínico.
- Considerando a facilidade de obtenção do linfonodo, sugere-se esta amostra como a mais viável para diagnóstico molecular da infecção por *L. infantum* em cães.
- A carga parasitária presente na medula óssea, linfonodo e baço de cães infectados por *L. infantum* aumentam a medida que se evidenciam os sinais clínicos expressos por estes animais (carga parasitária dos animais polissintomáticos > carga parasitária dos animais oligossintomáticos > carga parasitária dos animais assintomáticos).
- A carga parasitária apresentada na pele dos animais infectados por *L. infantum* é maior nos animais com sinais clínicos aparente (carga parasitária dos animais polissintomáticos > carga parasitária dos animais oligossintomáticos > carga parasitária dos animais assintomáticos).

## 8. Anexo

### FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Horário: \_\_\_\_\_ Responsável(is): \_\_\_\_\_

#### 1. FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Procedência do animal: \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( )M ( )F

Raça: \_\_\_\_\_ Pelagem: ( )curta ( )média ( )longa

Porte: ( )pequeno ( )médio ( )grande Cor: ( )branca ( )preta ( )marrom ( )cinza

Médico veterinário responsável: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

#### 2. AVALIAÇÃO DO ANIMAL

Início dos sinais clínicos: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Vermifugado: ( ) não ( ) sim

Normorexia: ( ) não ( ) sim

Micção normal: ( ) não ( ) sim

Emagrecimento: ( ) não ( ) sim

Oftalmopatia: ( ) não ( ) sim

Epistaxe: ( ) não ( ) sim

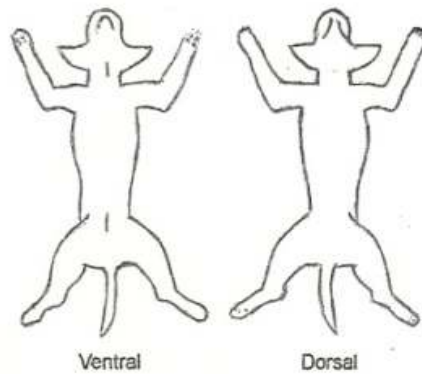
Problema articular: ( ) não ( ) sim

Linfadenopatia: ( ) não ( ) sim

Grifose: ( ) não ( ) sim

Dermatopatia: ( ) não ( ) sim

#### 3. LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES



Obs: \_\_\_\_\_

#### 4. EXAMES

##### Exame parasitológico

Punção medular ( ) não ( ) sim ( ) *esternal* ( ) *ilíaca* ( ) - ( ) +

Citologia cutânea ( ) não ( ) sim ( ) *pele íntegra* ( ) *pele lesionada* ( ) - ( ) +

Apirado linfonodo ( ) não ( ) sim \_\_\_\_\_ ( ) - ( ) +

Imuno-histoquímica ( ) não ( ) sim \_\_\_\_\_ ( ) - ( ) +

##### Exame sorológico

ELISA ( ) não ( ) sim ( ) - ( ) +

RIFI ( ) não ( ) sim ( ) - ( ) +

##### Biologia molecular

PCR ( ) não ( ) sim \_\_\_\_\_ ( ) - ( ) +

#### 5. RESULTADO