



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública



Milena de Paiva Cavalcanti

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
UM SISTEMA BASEADO EM PCR EM
TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* em cães**

RECIFE
2008

MILENA DE PAIVA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA BASEADO EM PCR EM
TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* em cães**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Co-orientadores: Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (*In memoriam*)
Dr. Wayner Vieira de Souza

**RECIFE
2008**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C376d Cavalcanti, Milena de Paiva.

Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães/ Milena de Paiva Cavalcanti. — Recife: M. de P. Cavalcanti, 2008.

138 f.: il., tabs.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Yara de Miranda Gomes, Frederico Guilherme Coutinho Abath e Wayner Vieira de Souza.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Primers do DNA. 5. Diagnóstico. I. Yara de Miranda Gomes. II. Frederico Guilherme Coutinho Abath. III. Wayner Vieira Souza.

CDU 616.993.161

MILENA DE PAIVA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA BASEADO EM PCR EM
TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* em cães**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yara de Miranda Gomes, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE

Dra. Constança Felícia De Paoli de C. Britto, PhD
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, RJ

Dr. Leucio Câmara Alves, PhD
Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE

Dra. Nilma Cintra Leal, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE

Dra. Maria Helena Silva Filha, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, PE

*Ao meu esposo Fábio e a minha
filha Marília, que são a fonte da minha
energia.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Yara de Miranda Gomes, por abrir as portas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), pela orientação e confiança.

Ao Dr. Wayner Vieira de Souza pela orientação na área estatística, por disponibilizar o seu tempo para atender com atenção e profissionalismo.

Ao Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath, cientista magnífico, que tive a honra de conhecer e ter como orientador, muito obrigada por me iniciar em uma área nova, pela paciência nas longas manhãs e tardes que passávamos juntos, discutindo qual o melhor passo a dar, que decisão tomar, como melhorar os resultados. Muito obrigada pela amizade, pelo apoio e, principalmente, pelo seu exemplo de ética, trabalho e dinamismo. A saudade é grande, mas agradeço a Deus pela oportunidade de tê-lo conhecido.

Ao Dr. Roberto Pereira Werkaüser, por todas as conversas, científicas e pessoais, pela amizade, por estar sempre disposto a ajudar.

À Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito, pelo companheirismo durante as atividades do Serviço de Referência em Leishmanioses e a amizade que surgiu no dia-dia.

Ao Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, por compreender as necessidades relacionadas à escrita de uma Tese de Doutorado, deixando-me à vontade para me organizar entre o trabalho e as atividades acadêmicas.

À Rosineide Lira e Mineo Nakazawa, por todo o apoio técnico.

Ao Dr. Fábio Lopes e Dr. Eduardo Henrique, pelo convívio saudável e pela troca de idéias.

A todos que compõem o Departamento de Imunologia do CPqAM; à equipe de Dra. Yara Gomes, pela recepção amigável e profissionalismo durante as atividades diárias. Ao grupo de pesquisa de Dr. Sinval, do qual estou feliz em fazer parte, uma equipe unida e organizada.

Aos colegas da turma de Doutorado em Saúde Pública do Aggeu Magalhães (2005-2009), pelos momentos de alegria e descontração durante as aulas.

Aos amigos, Fábria, Prof. Aparecida, Roberto, Paola, Filipe e Luciana pelos momentos sinceros, pelo ombro estendido, pelo apoio diário, por saber com quem contar.

A Rodrigo Lira, pelo apoio durante as coletas e pela análise estatística.

À Myllena Melo pela boa vontade em ajudar na realização das coletas.

Ao Hospital Veterinário Harmonia e ao LaborVet por confiar em meu trabalho e permitir a realização das coletas em suas dependências.

À Secretaria Acadêmica, pela competência, principalmente a Nilda Lima, pela simpatia e profissionalismo.

Ao CPqAM, por oferecer um curso de pós-graduação de excelente qualidade e pelo apoio financeiro nos primeiros meses. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro nos dois primeiros anos.

A minha família, base de minha formação ética e profissional. Ao meu esposo Fábio e a minha filha Marília, a realização pessoal que fornece a energia para a busca profissional, a força e o estímulo para continuar a caminhada.

A Deus...

Muito obrigada!

*“Surpreender-se com uma coisa é
o primeiro passo da mente no sentido da
descoberta.”*

Louis Pasteur (1822-1895)

PAIVA CAVALCANTI, M. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães.** 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2008.

RESUMO

O diagnóstico precoce da leishmaniose visceral (LV) é importante para evitar danos severos que podem levar o paciente à morte. Neste contexto, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos com destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR). Recentemente, a PCR apresentou um significativo avanço em sua tecnologia; é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Objetivou-se desenvolver e avaliar um sistema baseado em qPCR para o diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum* em cães, bem como efetuar uma análise comparativa com a PCR convencional utilizada no Serviço de Referência em Leishmanioses de Pernambuco. Com base na seqüência NCBI Z35273.1 de *L. infantum* disponível no BLAST-NCBI foram desenhados *primers* específicos para o complexo *L. donovani*. A combinação dos *primers* gerou sistemas de detecção, sendo o sistema Linf 1 B o mais promissor. A curva-padrão foi gerada resultando em limite de detecção de 10 fg de DNA genômico de *L. infantum* (7×10^{-2} parasitas), $\epsilon = 0.9417$, $R^2 = 0.931$ e $\text{slope} = -3.47$. O sistema desenvolvido foi avaliado em sangue de cães positivos e negativos para leishmaniose visceral canina, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 83,33%. A análise comparativa com o PCR convencional mostrou que, utilizando-se amostras de sangue, o qPCR é mais sensível (sensibilidade PCR= 23,8%, qPCR= 100%). Em relação à especificidade, apesar da PCR convencional ter apresentado valor de 100%, as análises por meio dos intervalos de confiança e o teste χ^2 mostraram que os dois testes (PCR convencional e qPCR) são equivalentes. Desta forma, conclui-se que os resultados obtidos para o sistema de qPCR, em amostra de sangue de cães e, a análise comparativa com a PCR convencional (RV1/RV2), sugerem sua utilização nas rotinas de diagnóstico da infecção por *L. infantum*.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, Reação em Cadeia da Polimerase, Primers do DNA, Diagnóstico.

PAIVA CAVALCANTI, M. **Development and evaluation of system based on real-time PCR for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs.** 2008. Thesis (Ph.D. in Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-CPqAM/FIOCRUZ, Recife. 2008.

ABSTRACT

Early diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) is important to prevent severe damage that can lead to the death of a patient. In this context, molecular methods have been developed over the past ten years which emphasize the technology of the polymerase chain reaction (PCR). Recent advances in the technology of PCR have shown that the quantitative real-time PCR (qPCR). The goal of this study was develop and evaluate a system based on qPCR for the diagnosis of the *Leishmania infantum* infection and to compare with conventional PCR used by the Leishmaniasis Reference Service of Pernambuco-Brazil. Based on the sequence NCBI Z35273.1 of *L. infantum* available in BLAST - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) specific oligonucleotides for *L. donovani* complex were designed. Detection systems were created by combination of primers, the system Linf 1B was the best. The standard curve was generated indicating a detection limit of 10 fg of *L. infantum* genomic DNA (7×10^{-2} parasites), $\epsilon = 0.9417$, $R^2 = 0.931$ and slope = -3.47. The system was evaluated in blood samples of dogs positive and negative for canine visceral leishmaniasis, showing sensitivity and specificity of 100% and 83.33%, respectively. The comparative analysis with conventional PCR showed that when blood samples are used, the qPCR is more sensitive (PCR sensitivity = 23.8%, qPCR = 100%). Regarding specificity, although the conventional PCR has presented value of 100%, the analysis by confidence intervals and χ^2 test showed that the two tests (conventional PCR and qPCR) are equivalent. Our conclusion is that the successful application of the qPCR system in canine blood samples indicates its applicability for the routine diagnosis of *L. infantum* infection.

Key-words: visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Polymerase chain reaction, primers, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1-	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral. 21
Figura 2-	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. Dependendo da espécie do protozoário envolvido, a doença evolui para a forma visceral ou cutânea. 23
Figura 3-	Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania</i> sp composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos podem ser visualizados na periferia da rede do kDNA. 30
Figura 4-	Representação gráfica das regiões conservada e variável dos minicírculos de <i>Leishmania</i> spp. 31
Figura 5-	Alinhamento da região conservada dos minicírculos de várias espécies de <i>Leishmania</i> e outros tripanossomatídeos mostrando os blocos de seqüências superconservadas. 31
Figura 6-	Corante SYBR Green I intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real. 36
Figura 7-	Sonda TaqMan sendo degradada após a adição dos nucleotídeos por ação da taqpolimerase durante a reação de PCR em tempo real. 36
Figura 8-	Curva de amplificação. As linhas coloridas representam quantidades decrescentes de DNA alvo (100 pg a 0,1 fg) quanto maior a quantidade de DNA (primeira linha verde), menor o valor de <i>Ct</i> (menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção). 37
Figura 9-	Interface do <i>software</i> ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4) mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta. Os pontos vermelhos representam os <i>Cts</i> gerados pelo <i>Log</i> de cada concentração de DNA padrão. 39
Figura 10-	Interface do <i>software</i> Mega (versão 3.1) mostrando parte do alinhamento de seqüências de DNA do minicírculo de <i>Leishmania</i> spp. Mesma cor representa similaridade entre as seqüências, cores diferentes significam divergência. 50
Figura 11-	ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA, USA), 51

conectado ao computador no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ.

- Figura 12- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do sistema Linf 1A mostrando boa performance para os padrões. NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* - 100 pg) com amplificação e formação de dímeros com T_m diferente do alvo. 59
- Figura 13- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do sistema Linf 1B mostrando boa performance para os padrões, NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* - 100 pg). 60
- Figura 14- Curva de amplificação do sistema Linf 2 mostrando boa performance para NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* - 100 pg) porém, padrões com comportamento não esperado. 60
- Figura 15- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do primeiro experimento de avaliação do limite de detecção. A linha verde mostra a boa performance do sistema em detectar até 1 fg de DNA genômico de *L. infantum*. No teste de especificidade (*L. braziliensis* - 100 pg) observa-se a formação de pico correspondente a amplicon com $T_m = 75^\circ\text{C}$ de um fragmento de aproximadamente 70 pb. 62
- Figura 16- Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando bandas específicas para *L. infantum* com 132 pb, ausência de bandas no NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* - 100 pg). 63
- Figura 17- Análise linear dos valores mínimo, máximo e média dos C_t s do logaritmo de cada concentração de DNA padrão. A: amostras; B: duplicatas. A análise das equações A ($y = -2.5999x + 32.08$), B ($y = -2.4833x + 32.206$) e intervalos de confiança (A: $B_0 = 27,25; 36,91$ $B_1 = -3,7; -1,5$ B: $B_0 = 26,81; 37,61$ $B_1 = -3,7; -1,3$), mostram não haver diferença significativa entre os ensaios. 64
- Figura 18- Interface do ABI PRISM 7500 SDS software (versão 1.4) mostrando a curva padrão do Log da concentração de DNA de *L. infantum*. A concentração de DNA variou de 10 fg a 10^7 fg/reação, atingindo os C_t s nos seguintes valores: 10^7 fg $C_t = 6.97$, 10^6 fg $C_t =$ 65

10.99, 10^5 fg Ct= 17.41, 10^4 fg Ct= 22.81, 10^3 fg Ct= 24.58, 10^2 fg Ct= 27.58, 10 fg Ct= 28.00. $R^2= 0.931$ e slope= -3.47.

- Figura 19- Curva de amplificação mostrando as espécies reconhecidas pelo sistema Linf 1B. *L. infantum* (alvo) Ct= 18,15; *L. major* Ct= 24,77; *L. mexicana* Ct= 26,74; *L. donovani* Ct= 19,85. NTC (controle negativo) Ct= 35,68. 66
- Figura 20- Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando bandas específicas para *L. infantum* com 132 pb até o limite de 1 fg de DNA padrão, ausência de bandas no NTC. Teste de especificidade com reconhecimento das espécies do complexo *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana*. 67
- Figura 21- Curva de amplificação mostrando amostras de 01 a 10 (A) e 11 a 21 (B), positivas pelo sistema Linf 1B. DNA padrão (A) (10 ng) Ct= 18.60; caso 01 Ct= 21.11; caso 02 Ct= 16.31; caso 03 Ct= 19.3; caso 04 Ct= 16.56; caso 05 Ct= 21.09; caso 06 Ct= 24.78; caso 07 Ct= 19.15; caso 08 Ct= 18.85; caso 09 Ct= 31.25; caso 10 Ct= 16.64; DNA padrão (B) (10 ng) Ct= 10.61; caso 11 Ct= 30.52; caso 12 Ct= 20.46; caso 13 Ct= 31.56; caso 14 Ct= 27.89; caso 15 Ct= 23.33; caso 16 Ct= 26.54; caso 17 Ct= 27.15; caso 18 Ct= 31.66; caso 19 Ct= 24.20; caso 20 Ct= 27.24; caso 21 Ct= 25.68. NTC (controle negativo) Ct= indetectável. 70
- Figura 22- Curva de dissociação mostrando amostras de 01 a 10 (A) e 11 a 21 (B), positivas pelo sistema Linf 1B. 71
- Figura 23- Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR convencional usando os *primers* RV1 e RV2 para as amostras positivas. Das 21 amostras consideradas casos, apenas cinco apresentaram banda específica de 145 pb. 73
- Figura 24- Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR convencional usando os *primers* RV1 e RV2 para as amostras negativas. As 12 amostras consideradas controles não apresentaram amplificação específica para banda de 145 pb. 74

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1-	Variações da PCR e suas principais características.	35
Tabela 2-	Isolados de <i>Leishmania</i> spp e <i>T. cruzi</i> usados para verificar a especificidade do sistema de PCR em tempo real.	53
Tabela 3-	Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.	55
Tabela 4-	Característica dos <i>primers</i> desenhados para desenvolvimento de um sistema baseado em PCR em tempo real para detecção da infecção por <i>Leishmania infantum</i> .	57
Tabela 5-	Sistemas de detecção formados por combinação dos <i>primers</i> desenhados para diagnóstico da infecção por <i>L. infantum</i> .	58
Tabela 6-	Alterações de temperaturas de anelamento e extensão para otimização do sistema Linf 1B, experimentos realizados com 40 ciclos.	61
Tabela 7-	Resultado dos exames para os animais classificados como casos.	68
Tabela 8-	Número de ciclos necessários para atingir o <i>threshold</i> por amostra estudada em reação de GAPDH qPCR.	69
Tabela 9-	Combinação binária entre os resultados obtidos pelo PCR em tempo real (sistema Linf 1B) e o diagnóstico verdadeiro da LVC.	71
Tabela 10	Carga parasitária e o número de ciclos necessários para atingir o <i>threshold</i> por amostra estudada.	72
Tabela 11-	Combinação binária entre os resultados obtidos pelo PCR convencional (sistema RV1/RV2) e o diagnóstico verdadeiro da LVC.	74
Tabela 12-	Análise comparativa entre os sistemas Linf 1B e RV1/RV2 baseados em qPCR e PCR convencional, respectivamente.	75
Tabela 13-	Resultado do Teste Qui-quadrado (χ^2) para comparação das proporções de sensibilidade e especificidade dos sistemas de PCR em tempo real (Linf 1B) e PCR convencional (RV1/RV2).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CSB	<i>Conserved sequence blocks</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Δ Ct	Diferença dos valores de Cts
°C	Graus Celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
kDNA	DNA do cinetoplasto
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fg	Fentogramas
g	Gramma
GAPGH	<i>Glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase</i>
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência indireta
kg	Quilograma
Kit	Conjunto diagnóstico
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
Log	Logaritmo

Mb	Megabase
min	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
NTC	<i>Non template control</i> (Controle negativo)
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	Quantitativa PCR
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
pg	Picograma
pmoles	Picomoles
R ²	Coefficiente de correlação
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
gRNA	<i>guide RNA</i>
s	Segundos
slope	Coefficiente angular
SUS	Sistema Único de Saúde
T _m	<i>Melting temperature</i>
U	Unidade
µg	Micrograma
µl	Microlitro

ε Eficiência da reação de qPCR

σ Especificidade da reação de qPCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Leishmaniose visceral	21
1.1.1	Distribuição geográfica	21
1.1.2	Etiologia	22
1.1.3	Epidemiologia	23
1.1.4	Patogênese e características clínicas	25
1.1.5	Diagnóstico	25
1.1.6	Situação atual e estratégias de controle	27
1.1.7	<i>Leishmania</i> sp - Características moleculares	28
1.2	Diagnóstico molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	32
1.2.1	Variações da PCR	33
1.2.1.1	<i>PCR em tempo real</i>	35
1.3	Justificativa	41
1.4	Hipótese	42
1.5	Objetivos	43
1.5.1	Geral	43
1.5.2	Específicos	43
2	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1	Desenho do estudo	45
2.1.1	Amostragem	45
2.1.2	Definição de casos e controles	45
2.1.3	Coleta de Material	46
2.1.3.1	<i>Coleta de sangue</i>	46
2.1.3.2	<i>Raspado cutâneo</i>	46
2.1.3.3	<i>Punção de medula óssea</i>	47
2.1.4	Diagnóstico parasitológico	47
2.1.5	Diagnóstico sorológico	47
2.1.6	Diagnóstico molecular	48
2.1.6.1	<i>Extração de DNA</i>	48

2.1.6.2	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	48
2.1.7	Processamento do material	49
2.2	Desenvolvimento do sistema de PCR em tempo real	49
2.2.1	<i>Primers</i>	49
2.2.2	Sistemas de detecção	50
2.2.3	Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade do sistema Linf 1B	51
2.2.3.1	<i>Sensibilidade</i>	51
2.2.3.2	<i>Eficiência</i>	52
2.2.3.3	<i>Especificidade</i>	52
2.2.4	Avaliação da Reprodutibilidade	53
2.3	Teste em amostras de sangue canino	54
2.3.1	Análise dos dados	54
3	RESULTADOS	56
3.1	Região alvo e desenho dos <i>primers</i>	57
3.2	Sistemas de detecção	57
3.3	Otimização do sistema Linf 1B	61
3.4	Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade do sistema Linf 1B	63
3.4.1	Sensibilidade e eficiência	63
3.4.2	Especificidade	65
3.5	Avaliação do desempenho do sistema Linf 1B em amostras de sangue a partir daqui, confirmar páginas	67
3.6	PCR convencional	73
3.7	Análise comparativa entre os sistemas Linf 1B (qPCR) e RV1/RV2 (PCR convencional)	75
4	DISCUSSÃO	76
5	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICES	100
A	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	101
B	Questionário para identificação dos animais-CASOS	102
C	Questionário para identificação dos animais-CONTROLES	103

D	Crêterios de Positividade	104
	ANEXOS	105
A	Parecer do Comitê de �tica no Uso de Animais (CEUA)	106
B	Artigo 1- Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits	107
C	Artigo 2- Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances	113
D	Artigo 3- Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias	121
E	Artigo 4- The development of a real-time PCR assay for the quantification of <i>Leishmania infantum</i> DNA in canine blood	135
F	Solicita�o de Notifica�o de Inven�o	138

1 INTRODUÇÃO

A taxa de infecção nem sempre é equivalente aos casos clínicos, variando, consideravelmente entre os países, sendo de 1:2,6 a 11:1 no Sudão (KHALIL et al., 2002; ZIJLSTRA et al., 1994), 4:1 no Kenya (SCHAEFER et al., 1995), 5,6:1 na Etiópia (ALI; ASHFORD, 1994), 13:1 no Iran (DAVIES; MAZLOUMI GAVGANI, 1999), 8:1 a 18:1 no Brasil (BADARO et al., 1986; EVANS et al., 1992) e 50: 1 na Espanha (MORAL; RUBIO; MOYA, 2002).

O Brasil é o principal responsável pela maioria dos casos registrados na América Latina e, segundo o Ministério da Saúde, a LV inicialmente tinha um caráter rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por calazar, barriga d'água, entre outros (BRASIL, 2004). Casos autóctones são notificados em, pelo menos, 19 estados da Federação, distribuídos em quatro, das cinco regiões, permanecendo indene apenas a Sul (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004; BRASIL, 2006). A maior incidência encontra-se na região Nordeste (70% do total de casos), onde a doença constitui-se em importante problema de saúde pública, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (ALEXANDRINO, 2001; BRASIL, 2006; GONTIJO; MELO, 2004).

1.1.2 Etiologia

A LV é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), estando inclusas duas espécies: *L. (Leishmania) donovani* e *L. (Leishmania) infantum*, dependendo da região geográfica. A denominação *L. chagasi* foi criada na suposição de tratar-se de uma espécie distinta, existente no Continente Americano antes da colonização europeia (REY, 2001). Assim, discussões referentes à nomenclatura têm levado em consideração a origem do parasita (DANTAS-TORRES, 2006a). Alguns autores acreditam que *L. chagasi* e *L. infantum* são idênticas, sendo importadas da Europa durante a colonização portuguesa e espanhola (KILLICK-KENDRICK, 1985, RIOUX et al., 1990); outros, afirmam que a *L. chagasi* já estava presente no Continente Americano antes da colonização Europeia (LAINSON; RANGEL, 2005).

Independente da origem, baseando-se em estudos imunológicos e genéticos, autores consideram que *L. infantum* e *L. chagasi* representam a mesma espécie (DANTAS-TORRES, 2006a; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000), outros pesquisadores consideram estas, como subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). Maurício, Stothard e Miles (2000) afirmam que os dados genéticos e enzimáticos tornam irrefutável a evidência de que *L. infantum*, descrita por Nicolle (1908) e *L. chagasi*, descrita por Cunha e Chagas (1937) devem ser consideradas sinônimos, tendo prioridade a nomenclatura mais antiga.

1.1.3 Epidemiologia

O protozoário completa seu ciclo biológico em dois hospedeiros (Figura 2). A forma amastigota do parasito ocorre num hospedeiro vertebrado, no interior de células do Sistema Fagocítico Mononuclear; sendo ingeridas pelos flebótomos ao succionarem o sangue do hospedeiro infectado. No inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se e tornam-se infectivas em 8-20 dias, sendo inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado no momento do repasto sanguíneo (DESJEUX, 2004).

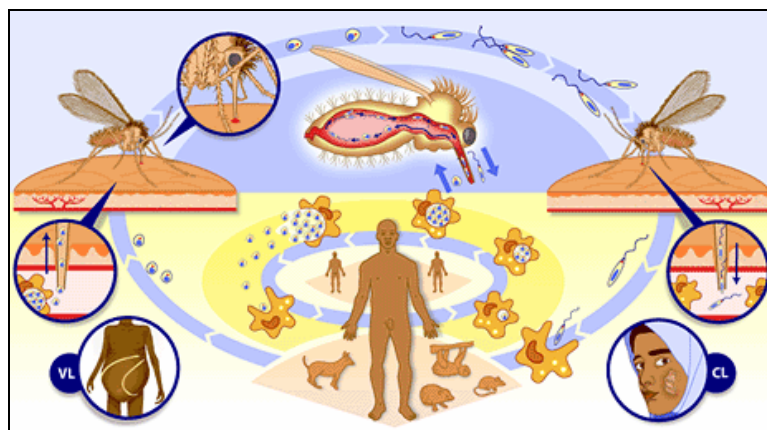


Figura 2- Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Dependendo da espécie do protozoário envolvido, a doença evolui para a forma visceral ou cutânea.

Legenda- VL: leishmaniose visceral, CL: leishmaniose cutânea.

Fonte- Organização Mundial de Saúde (2008).

Os principais reservatórios da doença nas Américas são os canídeos domésticos e silvestres. No Brasil, a presença da *L. infantum* já foi relatada no cão (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996).

O cão doméstico é considerado o reservatório de importância epidemiológica (FEITOSA et al., 2000; FRANÇA-SILVA et al., 2003; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997), uma vez que os casos humanos, normalmente, são precedidos por casos caninos, além de os cães apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele, favorecendo a infecção dos vetores (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). A proximidade do cão com os humanos tem sido referenciada como um importante fator de risco para a doença; no Nordeste brasileiro o aumento da incidência da LV, possivelmente associa-se à presença de cães no interior ou peridomicílio (CUNHA et al., 1995; DESJEUX, 2001).

Atualmente, no Brasil, a principal espécie de flebotômico (Diptera: Psychodidae) incriminada na manutenção do ciclo da doença é *Lutzomyia longipalpis* (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; LAINSON; RANGEL, 2005), havendo suspeita do papel vetorial de outras espécies tais como, *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* (PITA-PEREIRA et al. 2008). Nos últimos anos, tem sido especulada a competência vetorial do *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), o qual já foi encontrado naturalmente infectado, sendo capaz de transmitir, em condições experimentais, os parasitos a roedores, abrindo novas perspectivas na epidemiologia da leishmaniose visceral zoonótica (COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006b). Vários estudos têm confirmado outras formas de transmissão: por meio de transfusão sanguínea, de agulhas contaminadas entre usuários de drogas, transplantes de órgãos, infecções laboratoriais (GUERIN et al., 2002), por contato direto (LAINSON; BRAY, 1964; NUWAYRI-SALTI; KHANSA, 1985) e sexual (CATONE et al., 2003; SYMMERS, 1960). Mathur e Samantaray (2004) afirmam que a taxa de transmissão, por meio de transfusão sanguínea é bem mais alta do que a atualmente relatada, por ser de difícil confirmação em áreas endêmicas para a LV. Segundo Rosypal et al. (2005), em cães, a doença pode ser transmitida de forma congênita; fato que também foi confirmado em pacientes humanos (BOEHME et al., 2006).

1.1.4 Patogênese e características clínicas

Todos os membros do complexo *L. donovani* vivem, sob a forma amastigota, no interior de vacúolos das células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Dentro dos vacúolos parasitóforos multiplicam-se por divisão binária até que o acúmulo das formas amastigotas leve ao rompimento da célula (REY, 2001) e surgimento dos sintomas.

As características clínicas são semelhantes em cães e em humanos. O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante o qual o parasito se dissemina pelo corpo (OLIVA et al., 2006). A forma clássica caracteriza-se por sinais e sintomas de doença crônica persistente, incluindo febre ondulante, fadiga e perda de peso; a invasão das células sanguíneas e do sistema retículo-endotelial acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS et al., 2007; MANNA et al., 2006). Porém, o surgimento da doença e sua evolução são conseqüências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA et al., 2006).

O conhecimento dos fatores que predis põem um indivíduo a desenvolver a doença e outro a controlar a infecção é extremamente importante para o desenvolvimento de vacinas e o controle da enfermidade (CHAPPUIS et al., 2007). Com relação aos cães, alguns desenvolvem a doença clínica enquanto outros permanecem como portadores assintomáticos infectivos aos flebótomos e, desta forma, transmitindo a doença para outros cães e humanos (BANETH, 2008).

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico em cães pode ser feito com base nas características clínicas apresentadas pelos animais, confirmado por métodos laboratoriais diretos e indiretos (BONATES, 2003). Os métodos diretos compreendem a visualização do agente etiológico, por exemplo, pela demonstração do parasito em punções aspirativas de órgãos linfóides, enquanto os indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, por meio de provas sorológicas, além de detecção de DNA (FEITOSA et al., 2000;

THOMÉ, 1999). Atualmente, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a utilização de duas técnicas sorológicas, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), sendo a IFI a técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2004).

Em medicina veterinária, o clínico normalmente se confronta com casos sugestivos de doença canina, porém, muitas vezes, os testes diagnósticos apresentam resultados contraditórios (FRANCINO et al., 2006).

Em pacientes humanos, o diagnóstico da LV requer a demonstração microscópica das formas amastigotas em aspirados de tecidos linfóide ou hepático, em raspados de pele, ou em cultura (GRIMALDI; TESH, 1993; GUERIN et al., 2002; SCHALLING; OSKAM, 2002). Entretanto, estes exames podem necessitar de longo tempo para sua execução (SCHALLING; OSKAM, 2002). No Brasil, define-se como caso de LV, pacientes com exame parasitológico, cultivo ou IFI (título igual ou superior a 1:80) positivos (BRASIL, 2005).

O diagnóstico precoce é importante para evitar danos severos que podem levar o paciente à morte (SCHALLING; OSKAM, 2002). Neste contexto, os métodos convencionais apresentam limitações. O exame microscópico e a cultura são pouco sensíveis, sendo, a segunda, passível de contaminações, necessitando de maior tempo para a definição do diagnóstico. Métodos sorológicos podem ser úteis, porém, possuem problemas com reações cruzadas e diferenciação entre infecção atual e passada, não sendo acurados em pacientes imunossuprimidos (IKONOMOPOULOS et al., 2003; PIARROUX et al., 1994; WILSON, 1995; XIAO-SU et al., 2000). Desta forma, não existe um método que possa ser classificado como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp (WILSON, 1995).

Diante das limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, existe a necessidade de se desenvolver uma ferramenta que seja capaz de promover um diagnóstico acurado. Assim, há cerca de dez anos, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pool* de flebotomíneos (MICHALSKY et al., 2002), havendo destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens

indiscutíveis, da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

Recentemente, a PCR apresentou um significativo avanço em sua tecnologia; é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. Esta técnica, inovadora, vêm sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de cães e de humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004).

1.1.6 Situação atual e estratégias de controle

Por décadas, pesquisadores têm advertido sobre o aumento dos casos de LV no Brasil. A atual estratégia de controle não tem sido capaz de prevenir a expansão geográfica e a ascensão da incidência e letalidade (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Em todo o mundo, 35 países, incluindo o Brasil, já relataram casos da co-infecção *Leishmania* /HIV. As respostas imunes celular e humoral são suprimidas em pacientes co-infectados, o que favorece o risco das pessoas infectadas adoecerem, além de reduzir a sensibilidade dos testes sorológicos e aumentar a ineficácia do tratamento (ASHFORD, 2000; CHAPPUIS et al., 2007; MORENO et al., 2000).

O diagnóstico precoce e a rápida instituição do tratamento são importantes para o indivíduo e para a comunidade. Pacientes não tratados atuam como reservatórios e contribuem para a transmissão antroponótica (CHAPPUIS et al., 2007).

As perspectivas de controle são dependentes do progresso em pesquisas para se obter melhores alternativas e estratégias de gerenciamento dos casos e controle dos vetores (DESJEUX, 2004). O programa de controle adotado no Brasil baseia-se em três principais estratégias: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, inquéritos sorológicos com eutanásia dos cães positivos e, vigilância

entomológica. As medidas adotadas relacionam-se com a classificação das áreas com e sem transmissão vetorial (BRASIL, 2004). Tais estratégias de controle não têm sido capazes de reduzir a incidência dos casos humanos (COSTA; VIEIRA, 2001).

Trabalhos atuais discutem as fragilidades dos programas de controle e o desconhecimento ou o conhecimento insuficiente da biologia do agente etiológico (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; SHAW, 2007), assim, a leishmaniose está se tornando uma doença global. Segundo Shaw (2007), apenas quando for obtido um melhor entendimento da diversidade genética da *Leishmania* spp e dos reservatórios envolvidos no ciclo enzoótico de cada espécie será possível avaliar qual o método ou métodos de controle mais eficazes. No subcontinente Indiano, além do diagnóstico precoce, tratamento dos casos, controle integrado de vetores, medidas também adotadas pelo programa de controle brasileiro, existe a preocupação com a mobilização social e o envolvimento científico (CHAPPUIS et al., 2007).

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

1.1.7 *Leishmania* sp - Características moleculares

Estudos recentes revelaram que *L. major* e *L. infantum* têm 36 cromossomos, enquanto *L. braziliensis* possui apenas 35. O tamanho do genoma haplóide de *L. infantum* é de, aproximadamente, 33 megabases (Mb), com 8.145 genes

identificados (PEACOCK et al., 2007). De acordo com a equipe do Projeto Genoma para *L. infantum* (The *Leishmania infantum* Genome Project), a quantidade de DNA total em um parasita é de ~147 fentogramas (fg) (Informação verbal¹).

Os níveis de expressão gênica variam consideravelmente entre as espécies, o que pode estar relacionado com a patogênese de cada forma clínica das leishmanioses. Aproximadamente 8% dos genes parecem estar envolvidos nos processos metabólicos e diferenciações gerais entre *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, relacionando-se com a sobrevivência do parasito no hospedeiro e surgimento da doença. A identificação destes genes espécie-específicos pode auxiliar na identificação dos fatores parasitários que influenciam a infecção. Adicionalmente, os fatores que são únicos para o gênero *Leishmania* e comuns à todas as espécies, podem ser usados como fármacos potenciais ou candidatos a vacinas (PEACOCK et al., 2007).

De modo geral, os protozoários do gênero *Leishmania* correspondem a um grupo de microrganismos biologicamente distinto (SIMPSON, 1987). Possuem uma mitocôndria incomum que contém características de ácido desoxirribonucléico (DNA), conhecida por cinetoplasto. O cinetoplasto é incomum porque possui arranjos de dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que juntos, formam uma rede compacta de DNA, o kDNA, que corresponde entre 15% e 35% do DNA total celular (Figura 3) (BREWSTER; ASLETT; BARKER, 1998; BREWSTER; BARKER, 2002; LAMBSON; BARKER, 2002; SIMPSON, 1987).

Os minicírculos representam 95% do kDNA (RAY, 1987). Há muito tempo, tais estruturas celulares têm sido um mistério em termos de uma possível função genética (DONELSON; GARDNER; EI-SAYED, 1999). A maioria dos trabalhos relatam a participação destes na síntese dos ácidos ribonucléicos guias (gRNA), que são necessários para edição dos genes codificados pelos maxicírculos; que, por sua vez, codificam o RNA mensageiro para síntese de proteínas mitocondriais, sendo essencial para a função genética mitocondrial dos tripanosomatídeos (BREWSTER; BARKER, 2002; STURM; SIMPSON, 1991).

¹ Comunicação pessoal com Dr. M. Berriman, Projeto genoma *Leishmania infantum*.

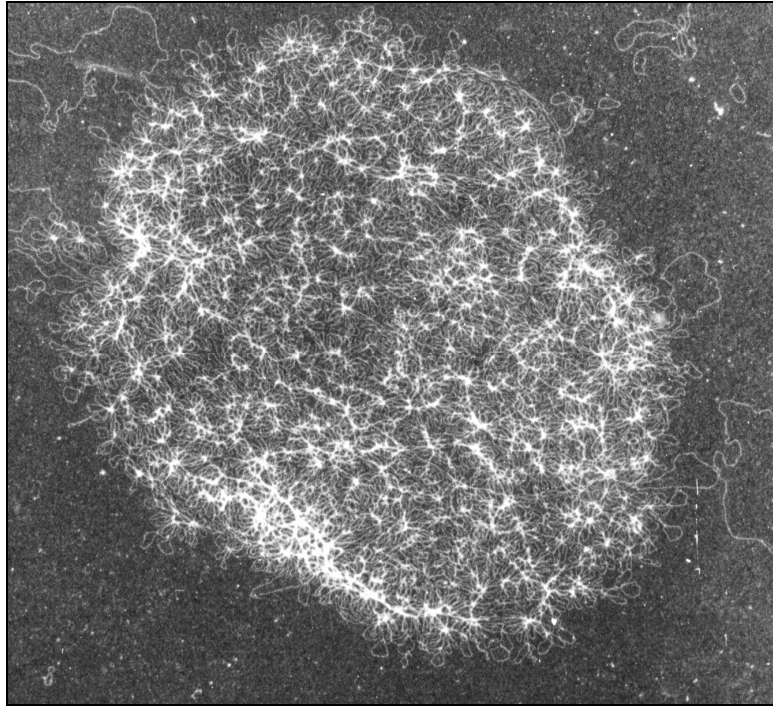


Figura 3- Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania* sp composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos podem ser visualizados na periferia da rede do kDNA.
Fonte- Barker (1989).

Os minicírculos de *Leishmania* sp contêm cerca de 800 pares de base (pb) em tamanho, podendo atingir até 1200 pb, sendo, aproximadamente, 120 a 200 pb correspondente a região de seqüência conservada e o restante da molécula corresponde a uma região variável (Figura 4) (BARKER, 1980; MORALES et al., 2001; NOYES et al., 1998). A heterogeneidade da região variável tem sido explorada para discriminar entre cepas de uma mesma espécie (NOYES et al., 1998). Em estudo recente, realizado em 120 isolados de pacientes humanos, cães e flebotomíneos em Portugal, observou-se uma heterogeneidade genética dentro de uma mesma população parasitária (CORTES et al., 2006). De acordo com Cupolillo et al. (2003), a diversidade genética de *L. braziliensis* está relacionada às diferentes regiões geográficas do Brasil, ou seja, um determinado genótipo associa-se a uma região específica, provavelmente, refletindo uma adaptação de diferentes clones à espécie de vetor envolvida.

Por outro lado, a região conservada do minicírculo possui três blocos de seqüências superconservadas (CSB: conserved sequence blocks) de 10, 8 e 12 pb (CSB-1, CSB-2, CSB-3, respectivamente) (Figura 5).

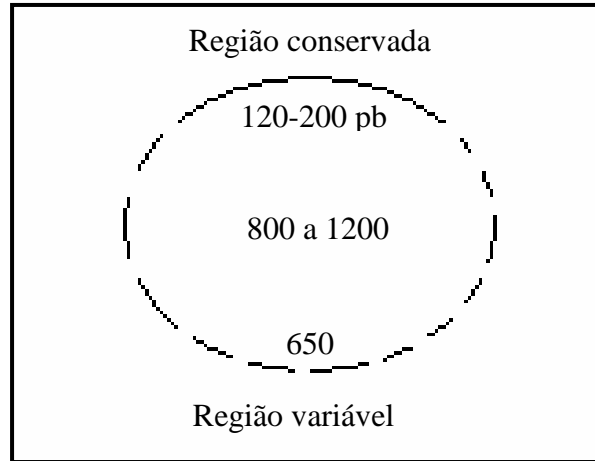


Figura 4- Representação gráfica das regiões conservada e variável dos minicírculos de *Leishmania* spp.

Fonte- Adaptado de Rodgers; Popper; Wirth (1990).

<i>T. rangeli</i>	CATTTTGGGAGGGGCGTTCAGATTTATGGATGGGAATGCATACATCTCCCCCAA-----AAATCAGCATTTTCAGG-----AAACAGGATTCGATTTGGGTTAGTGTAAATATAGCACGGGTGGG
<i>T. triglae</i>	GGTTTTCGGCGGGCGTGCACCTTTTTCTTAAAGCCATACAGGAGCCCGGTTCTGAAATCGTCAAAAAATGGCCT-TTTTT--CAGGGTGGGTCGATAGGGGTTGGTGTAAATATAGCACGGTTGCT
<i>T. carassii</i>	GTTTTCGGGACGGGCGTGCACCTTTTTCTTAAAA-GCCATACAGGAGCCG-GTTC TAAATCGTCAAAAAGAGGCGAAAAAGCTGGTGGTGCCTTCGATAGGGGTTGGTGTAAATATAGCACGGACCTA
<i>Toruzii</i>	AGTTTTGGGAGGGGCGTTCAAATTTGGGCGGAAAAATCATGCATCTCCCCGTTACATTATTTGGGATTTAGGGGGTTGTTCAATGGAGGTGGGTTTCGATAGGGGTTGGTGTAAATATAAGTTAGGTATG
<i>T. cruzi2</i>	TGATTTGGGAGGGGCGTGCAGATTTTGGGCGGAAATTCATGCATCTCCCGGTACATTATTTGGTATTTAGGGGGTTGTCCACGCGAGGTGGGTTTCGATAGGGGTTGGTGTAAATATAGCACAGATTGTT
<i>T. scelopori</i>	CAAAATTTAGGGGCGTTCACCTTTATAGCCAAAAATAGCGCATGTCCCCGTTACAAAAATGGCCAAAAACGCTAATTTTCCAGGAGTGGTGC-TTCGATAGGGGTTGGTGTAGAAATATTATGTTGA
<i>T. congo</i>	AGGTTTTGGTAGGGCGTTCACCTTTATGGGAAAAATGCATACGTGGCGGCTACAAAAATGGGATTTTTTTGGCTATTTGGAGCAGGTTGGGGTTTCGAAAGGGGTTGGTGTAAATACCCGGTGGGGTT
<i>T. equip</i>	GAAAATCTTATGGGCGTGCAGATTT-----CACCATACAAAAATCATCTGTCTATTTTCGGGGTTTTTTAGGTCCGAGGTAC-----TTCGAAAGGGGTTGGTGTAAATACACACAAGGTTTT
<i>T. brucei</i>	GAAAATCTTATGGGCGTGCAGAA-----AATACACATACAAAAATCCCGGTCTATTTTGGGGCATTTTTGGAGTCCGAGGTAC-----TTCGAAAGGGGTTGGTGTAAATACACACAAGGATTT
<i>Herpetomon</i>	GTTTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATTTGATTCGGGCATACAGAA-CTACGCACATAAATTTGGCCATTTTTTCGGCTCGGGAACAAAATTTGACAGAACTAGGGGTTGGTGTAAATATAGGCTGGCTGGT
<i>Endotryp58</i>	CCTCTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAAGGCCAAAAAGTGCCTTAGGAATCAAAAATCG-GCGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATATAGTGGCGGGTC
<i>Endotryp341</i>	CCTTTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAAGGCCAAAAAGTGCCTTAGGAATCAAAAATCG-GCGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATATAGTGGGAGGTA
<i>L. peruviana</i>	CCTCTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAAGGCCAAAAAGTGCCTTAGGAATCAAAAATCG-GCGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATATAGTGGGCGGCG
<i>L. guyanen</i>	CCTCTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAATCGCCGAAATCAGCTTTTT-TGCCCTCCCGTGCACAATAGGGGTTGGTGTAAATATAGTGGCGCGC
<i>L. brazil</i>	CCTCTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAATCGCCGAAATCAGCTTTTT-TGCCCTCCCGTGCACAATAGGGGTTGGTGTAAATATAGTGGCGCGC
<i>L. guliki</i>	CCCTCAGGTTAGGGCGTTCGCGAAAACCG-AAAAACGATGCAGAAACCCCGTTCAAAAATGGCCAAAAATCGGATTTTT-TGAGATTTTCGGGTGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGCGGGCAC
<i>L. gymno</i>	CCCTCAGGTTAGGGCGTTCGCGAAAACCG-AAAAATCGATGCAGAAACCCCGTTCAAAAATGGCCAAAAATCGCCATTTTT-TTCGATTTTCGGTGTGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGGTTGGGCT
<i>L. tarent</i>	CCCTCAGGTTAGGGCGTTCGCGAAAACCG-AAAAATCGATGCAGAAACCCCGTTCAAAAATCGCCGAAATCAGCTTTTT-TTCAATTTTCGGTGTGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGGTTGGGCT
<i>L. mex379</i>	CCGTTGGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATGGCCAAAAATGAGTGCAGAAACCCCGTTCAAAAT-TCCCGGAAAAATCCGGAAATTCGGCTCGGGGCGGGGAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGCGGCGGGGT
<i>L. mexBEL21</i>	CCGTTGGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATGGCCAAAAATGAGTGCAGAAACCCCGTTCAAAAT-TGGGGAATTTTTCGAAAATCGGCTCGGGGCGGGGAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGCGGCGGGTG
<i>L. amazon</i>	CCGTTGGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATGGCAAATGGCATACAGAAACCCCGTTCAAAAT-TCCGGGAAATTCGGGAAATTCGGCTCGGGGCGGTGAAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGGCGGCTGC
<i>L. infantum</i>	CCTCCGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATCGG-AAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAAAAAT-CGGCCAAAAATGCCAAAAATCGGCTCCGGGCGGGGAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGGCGGGTG
<i>L. donovani</i>	CCTCCGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATCGG-AAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAAAAAT-CGGTCAAAAATGCCAAAAATCGGCTCCGGGCGGGGAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGCGGGTGG
<i>L. chagasi</i>	CCTCCGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATCGG-AAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTTCAAAAAT-TGGTCAAAAATGCCAAAAATCAACTCCGGGCGGGGAACTAGGGGTTGGTGTAAATAGGGCGGATGGT
<i>L. amazon</i>	CCTCCGGTTAGGGCGTTCGCGAAATTCG-AAAAATCGATGCAGAAACCCCGTTCAAAAATTCGAGGAAAAATGCCAATTTTTGGCCTTGGGCGTGCAAAATAGGGGTTGGTGTAAATAGGGCGGGTGGG
<i>L. mexicana</i>	CCTCCGGTTAGGGCGTTCGCGAAATTCG-AAAAATCGATGCAGAAACCCCGTTCAAAAAT-CCAGGAAAAATGCCAATTTTTGGCCTCGGGGCGTGCAAAATAGGGGTTGGTGTAAATAGGGCGGGTGGG
<i>Phytomonas</i>	TGTTGGTTAGGGCGTTCGCAAAAATCG-TGTTTTTATGCATAACTCCCGTTCAAAAT--CGTGTTTTTTCGATTTTTCGATTTTGTCACTCGAGGGGGTTTTAGGGGTTGGTGTAAATATAAGTGGTTTTT
<i>C. fasc</i>	GTCTCGGTTAGGGCGTTCGCGAAAATCG-GTTTTTATACAGAAATCCCGTTCAAAAAT--GGCAGTTTTCTCAATTTT-TGAGGCAAGTTGGGGATTTCCGGGTTGGTGTAGGATTCGGGGGCTGC

Figura 5- Alinhamento da região conservada dos minicírculos de várias espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos mostrando os blocos de seqüências superconservadas. Legenda- CSBs: blocos de seqüências conservadas.

Fonte- <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/ASP/ermmSearch>O terceiro bloco de região conservada (CSB-3) contém a seqüência 5'- GGGGTTGGTGTA - 3', denominada "seqüência universal do minicírculo", a qual está presente em todos os minicírculos seqüenciados de tripanossomatídeos (RAY, 1989; RODRIGUEZ et al., 2000), e representa a origem de replicação dos mesmos. Estas características têm levado diversos trabalhos a explorar o kDNA para fins de diagnóstico (MANNA et al., 2004; MANNA et al., 2008; MARY et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007), possibilitando a detecção da infecção por *L. infantum* em diferentes amostras clínicas.

1.2 Diagnóstico molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nos últimos anos, a genética, biologia celular, seqüenciamento do genoma de patógenos, entre outros, têm mudado, de forma significativa, as oportunidades para realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, diagnóstico e controle de doenças microbianas. Em 1983, o desenvolvimento da PCR por Kary B. Mullis (MULLIS; FALOONA, 1987; MULLIS, 1990) foi considerado como o grande avanço da biologia molecular. Devido ao alcance da popularidade da técnica, Kary B. Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Esta técnica estendeu o alcance da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações, inclusive em áreas fora do seu campo tradicional, tais como, medicina, agricultura e biotecnologia (BROWN, 2003).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação com DNA, e resultados falso-negativos, relacionados com a presença de inibidores da PCR (YANG; ROTHMAN, 2004). Nos resultados falso-positivos, na maioria dos ensaios patógeno-específicos, a fonte predominante de contaminação é derivada de produtos amplificados em reações anteriores que podem ser transportados por meio dos reagentes, tubos, pipetas e bancadas. Boas práticas de laboratório e separação física das áreas de pré-amplificação e pós-amplificação podem reduzir os riscos de contaminação. O uso de métodos baseados na irradiação ultravioleta, tratamento químico ou digestão enzimática também são

úteis para evitar tais contaminações (CARROL; ADAMSON; OKHRAVI, 1999; CORLESS et al., 2000). Resultados falso-negativos podem decorrer de um volume amostral relativamente abaixo do permissível para a reação, além de problemas associados com o processamento. Exemplos de inibidores da polimerase que possam estar presentes nas amostras de DNA: fenol, proteinase K, excesso de EDTA, hemoglobina e outras proteínas de hemáceas, SDS, elevadas concentrações de sal. Tais obstáculos podem ser superados com tratamento adequado da amostra por meio de uma correta extração e purificação do DNA e remoção dos inibidores, como por exemplo, EDTA, heparina, hemoglobina, uréia, entre outros (BESSETTI, 2007; GRIBBEN et al., 1991; YANG; ROTHMAN, 2004).

A PCR reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ou sondas que irão hibridizar-se especificamente à seqüência alvo (YANG; ROTHMAN, 2004).

Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo seqüenciados, catálogos de genes podem ser explorados para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em PCR; como resultado, desde a década passada, encontram-se disponíveis comercialmente muitos ensaios baseados nesta técnica, os quais continuam a se expandir. Neste contexto, o *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou a utilização de ensaios baseados em PCR para a detecção de vários patógenos, como por exemplo, *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovírus, *Gardnerella vaginalis*, *Human immunodeficiency virus*, *Human Papillomavirus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, entre outros (YANG; ROTHMAN, 2004).

1.2.1 Variações da PCR

Caso a PCR seja utilizada para a detecção de um agente viral, é importante levar em consideração que os genomas de muitos vírus, de grande importância clínica, são compostos de RNA ao invés de DNA. Neste caso, é necessária a realização da transcrição reversa antes de se iniciar a amplificação por PCR, a qual

é realizada tratando-se a amostra com a transcriptase reversa. Esta enzima é capaz de sintetizar uma fita de DNA complementar à molécula de RNA que servirá de alvo para a PCR convencional, esta técnica é conhecida como RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) (YANG; ROTHMAN, 2004).

Nas duas últimas décadas, a técnica da PCR tem sido modificada para expansão do seu uso e versatilidade (YANG; ROTHMAN, 2004). A possibilidade de utilização, na mesma reação, de mais de um par de *primers* com amplificação simultânea de múltiplas seqüências do DNA-alvo é chamada de multiplex-PCR (Tabela 1). Assim, mais de uma seqüência de DNA, em uma mesma amostra, pode ser amplificada ao mesmo tempo (BAHK et al., 2004; CHAMBERLAIN et al., 1988; GEHA et al., 1994; REA et al., 2001).

A *nested-PCR* utiliza dois pares de *primers* para amplificação de uma seqüência interna ao DNA alvo selecionado (Tabela 1). O primeiro par é usado para uma primeira reação, onde os produtos são submetidos a uma segunda amplificação com um outro par de *primers*. Esta técnica apresenta maior sensibilidade e especificidade, porém também aumenta o risco de contaminação com o produto amplificado da primeira reação, uma vez que requer a abertura do tubo, após o primeiro ciclo de amplificação, para transferência dos *amplicons* para um segundo tubo, ou adição de novos reagentes e/ou *primers* (ABATH et al., 2002). Assim, para contornar essa situação, Abath et al. (2002) trabalharam com a imobilização dos *primers* da segunda reação na parte interna da tampa do tubo onde a reação está ocorrendo, entrando em contato com a seqüência alvo após a primeira amplificação, padronizando a *nested-PCR* no mesmo tubo (*single tube nested-PCR*).

Apesar da PCR e suas variações serem altamente sensíveis e específicas, apresentam algumas limitações, tais como, a necessidade de se realizar a eletroforese em gel de agarose ou pliacrilamida, o uso de reagentes nocivos à saúde do operador, como, por exemplo, o brometo de etídio, riscos de contaminação e a ausência da capacidade quantitativa. Estas desvantagens passaram a ser mais evidenciadas no final do século XX e início do século XXI devido ao surgimento de uma nova tecnologia, a quantitativa PCR em tempo real (qPCR).

Tabela 1- Variações da PCR e suas principais características.

PCR		
Nested PCR	Multiplex PCR	qPCR
Reamplificação de uma região interna ao alvo	Uso de mais de um par de <i>primers</i>	Uso de sondas fluorescentes
Maior sensibilidade e especificidade	Detecção de mais de um alvo na mesma reação	Capacidade quantitativa

1.2.1.1 PCR em tempo real

No início da década de 90 estudos passaram a explorar a atividade exonucleásica da taq polimerase para o desenvolvimento de sondas TaqMan (HOLLAND et al., 1991). Em 1992, Higuchi e colaboradores passaram a explorar a capacidade quantitativa da PCR utilizando o brometo de etídio (HIGUCHI et al., 1992). Tais estudos promoveram um refinamento da original PCR de Kary Mullis e surgimento da PCR em tempo real (qPCR), representando um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias.

O sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é a SYBR Green I (Figura 6), que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma assimétrica cianina que, livre em solução não emite fluorescência mas, ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso (NYGREN; SVANVIK; KUBISTA, 1998). A toxidez do brometo tem levado a uma maior popularidade da SYBR Green (BENGTSSON et al., 2003; ZIPPER et al., 2004).

Outra forma de gerar a fluorescência é o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da seqüência que se deseja amplificar, um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan (Figura 7). À medida que vai ocorrendo a amplificação, a taq polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda TaqMan (contendo o fluorocromo, *reporter*) e cliva a sonda.

Pelo fato do repórter ser liberado e não permanecer próximo ao *Quencher*, há liberação de fluorescência.(MORTARINO et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004).

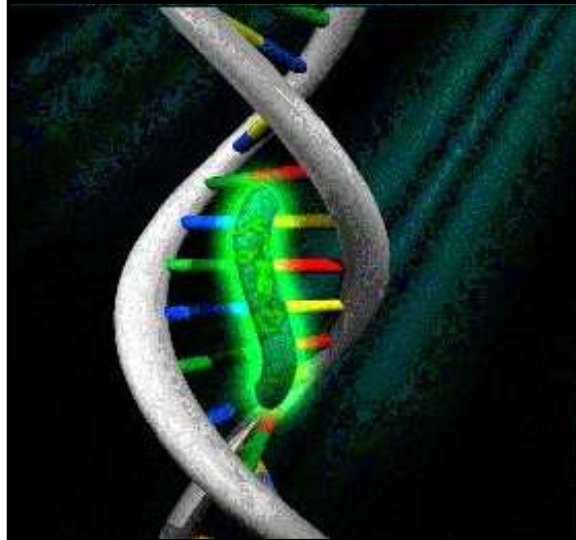


Figura 6- Corante SYBR Green I intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real.

Fonte: Applied Biosystems®

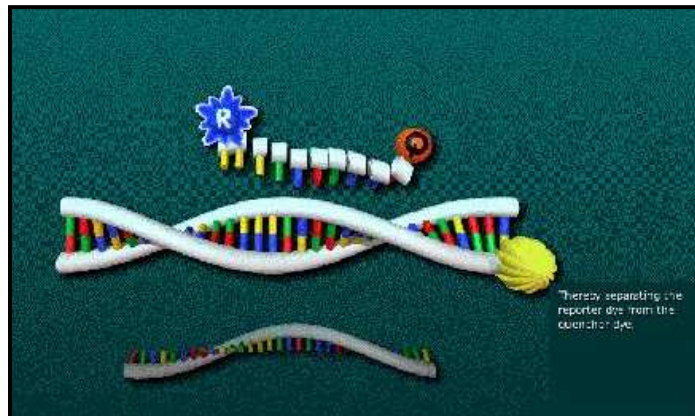


Figura 7- Sonda TaqMan sendo degradada após a adição dos nucleotídeos por ação da taqpolimerase durante a reação de PCR em tempo real.

Legenda- R: repórter; Q: quencher.

Fonte- Applied Biosystems®

A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006). O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado *Ct* e, o momento em que o *Ct* é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (MORTARINO et al., 2004), ou seja, denominando-se *Ciclo Threshold* ou *Ct* o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*) (INSTITUTO FLEURY, 2004) (Figura 8).

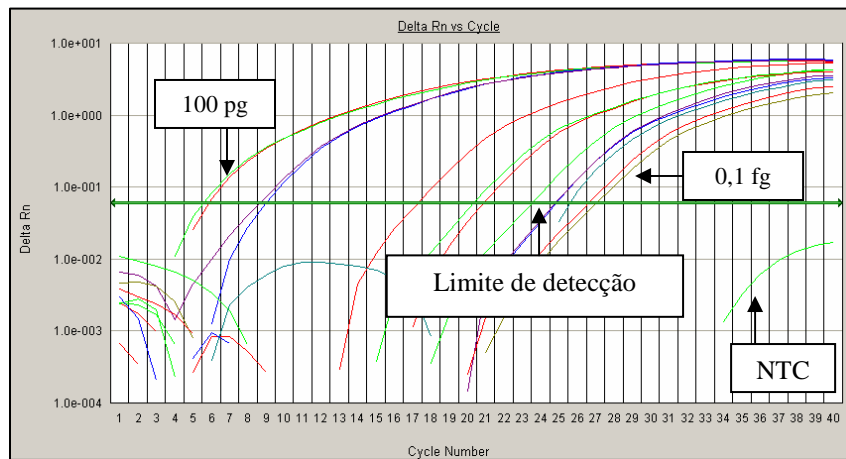


Figura 8- Curva de amplificação. As linhas coloridas representam quantidades decrescentes de DNA alvo (100 pg a 0,1 fg) quanto maior a quantidade de DNA (primeira linha verde), menor o valor de *Ct* (menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção).

Legenda- NTC: controle negativo (sem amplificação).

A análise dos resultados de um ensaio de qPCR é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador. Basicamente, são efetuadas quatro análises: 1) Curva de amplificação, 2) Curva de dissociação, 3) Espectro e 4) Componente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

1) Com a curva de amplificação pode-se verificar o *Ct* de cada amostra analisada (Figura 8), o que será de fundamental importância para o cálculo da especificidade (σ) e determinação das amostras positivas. Segundo Too (2003), valores de *Cts* superiores a 35 indicam resultados falso-positivos.

2) Por meio da curva de dissociação evidencia-se a emissão de fluorescência pela temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m). A T_m é a temperatura onde 50% dos produtos amplificados encontram-se dissociados, na forma de fita simples, causando uma queda brusca da intensidade de fluorescência pela liberação do corante SYBR Green (BROWN, 2003). Nesta análise podem ser verificadas amplificações inespecíficas e dímeros de *primer*.

3) A avaliação do espectro mostra a captação da fluorescência por filtros determinados, ou seja, cada corante ou fluorocromo usado emite luz que será absorvida por um filtro determinado. Por exemplo, a SYBR Green I é captada pelos filtros A e B, enquanto a ROX (referência passiva ou *background*) é lida pelos filtros C e D (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005), assim, à medida que uma reação positiva ocorre, a absorção de fluorescência pelos filtros A e B deve superar a captação dos filtros C e D, as quais permanecerão constantes. Caso a SYBR Green não supere a ROX a reação é negativa.

4) O componente mostra o comportamento da emissão de fluorescência por cada corante ou fluorocromo usado durante a reação. Desta forma, a referência passiva deve se manter constante e o corante usado superará-la à medida que os ciclos da PCR vão sendo executados. É importante salientar que, caso seja utilizada sonda TaqMan, três parâmetros são evidenciados: a referência passiva, o fluoróforo (*reporter*) e o inibidor ou receptor de sinal luminoso (*quencher*) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Os quatro parâmetros devem ser analisados em conjunto. Padrões com concentrações pré-determinadas de DNA alvo e controles negativos (NTC: non template control) devem ser incluídos em todas as reações e avaliados em primeiro lugar; padrões com comportamento adequado garantem a segurança dos resultados para as amostras em teste.

A PCR em tempo real permite, basicamente, a realização de três tipos de ensaios: quantificação absoluta, quantificação relativa e discriminação alélica (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001), os quais possuem diferentes e variadas aplicações. Como ferramenta diagnóstica, a quantificação absoluta pode ser utilizada para detecção da infecção e quantificação de seu agente etiológico. O ensaio de quantificação absoluta, baseia-se na análise da curva-padrão (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005) (Figura 9).

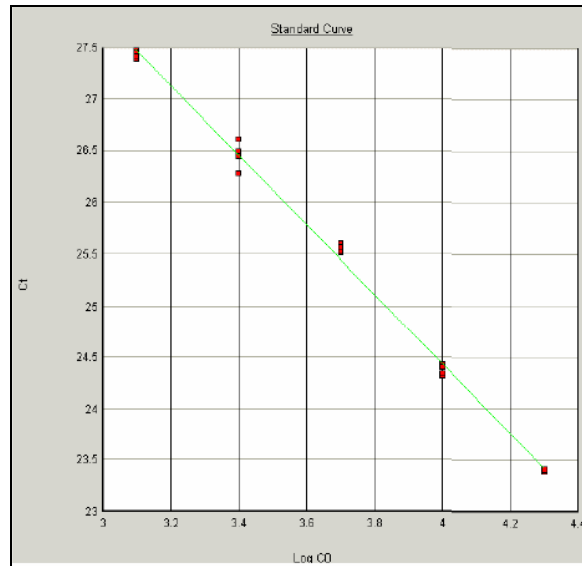


Figura 9- Interface do *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4) mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta. Os pontos vermelhos representam os *Cts* gerados pelo *Log* de cada concentração de DNA padrão.

Como está explícito na definição, a curva-padrão relaciona-se às concentrações de DNA padrão. É por meio destes dados, ou seja, quantidades conhecidas de DNA, que o *software* efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

A curva-padrão também fornece o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva. Este dado será importante para o cálculo da eficiência da amplificação (ϵ), uma alta eficiência está associada a uma inclinação de, aproximadamente, 3,32 para cada diluição de 10 do alvo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005; TOO, 2003). *Slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR (KUBISTA et al., 2006).

As características da PCR em tempo real possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (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 são inúmeras e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (SUNDSFJORD et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004). Essa tecnologia,

que é altamente sensível, já está sendo desenvolvida para o acompanhamento de inúmeras doenças, tais como AIDS, hepatite C, dengue, toxoplasmose e as leishmanioses (FRANCINO et al., 2006; KOMPALIC-CRISTO et al., 2007; MANNA et al., 2006; MANNA et al., 2008; MARY et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; RAOULT; FOURNIER; DRANCOURT, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A qPCR é uma técnica inovadora capaz de promover a quantificação acurada do *imput* de DNA e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. O sistema de quantificação possui aplicações variadas, incluindo identificação de alelos em DNA genômico, análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes, análise de patógenos em alimentos, análise de produtos transgênicos, além da aplicação em diagnóstico (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Muitos alvos podem ser monitorados simultaneamente usando fluorocromos com diferentes espectros de emissão (RAOULT; FOURNIER; DRANCOURT, 2004).

Em estudo recente, Kompalic-Cristo et al. (2007) examinaram o valor diagnóstico da PCR em tempo real em detectar e quantificar *Toxoplasma gondii* em sangue humano, concluindo que o sistema é capaz de quantificar leituras parasitárias em baixas concentrações, podendo verificar um aumento no número de parasitos em indivíduos sorologicamente identificados com toxoplasmose aguda.

Em medicina veterinária, sistemas utilizando SYBR Green, têm sido aplicados para quantificação de *Borrelia burgdorferi* em modelo experimental para a doença de Lyme (MORRISON et al., 1999).

Com relação à LV, a técnica vem sendo utilizada em cães e em pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; ROLÃO et al., 2004; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004). Mary et al. (2004) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *L. infantum* em amostras de sangue e o *status* clínico dos pacientes, permitindo discriminar entre pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, promovendo o diagnóstico e monitoramento da terapia com segurança e rapidez.

Atualmente, existem conjuntos diagnósticos disponíveis para a detecção e quantificação de DNA e RNA em amostras clínicas, especialmente desenvolvidos

para o acompanhamento de pacientes com AIDS e hepatite C (RAOULT; FOURNIER; DRANCOURT, 2004). Diante do exposto, como para alguns autores, a PCR tem sido previamente definida como “padrão-ouro”, a quantitativa PCR em tempo-real certamente será a técnica de referência no futuro (MARY et al., 2004).

1.3 Justificativa

O conhecimento de seqüências de DNA tem sido extensivamente explorado para o desenvolvimento de ensaios baseados em PCR, tanto para o diagnóstico da leishmaniose como identificação da espécie parasitária envolvida na infecção (SCHALLING; OSKAM, 2002).

As características da PCR promoveram sua adoção no diagnóstico de alta complexidade para as leishmanioses no Brasil; havendo variações nos sistemas utilizados em cada região.

O sistema desenvolvido por Ravel et al. (1995) e adaptado por Fichoux et al. (1999) é conhecido pela denominação de seus *primers* RV1 e RV2, tendo como alvo a região conservada dos minicírculos do kDNA de *L. infantum*, amplificando um fragmento de 145 pb. Inicialmente, os resultados de Ravel et al. (1995) mostraram uma excelente sensibilidade em detectar *L. infantum* em macrófagos humanos; aproximadamente um parasita por 10^6 células mononucleares experimentalmente infectadas. Fichoux et al. (1999) após inquérito sorológico em doadores de sangue no sudeste da França, obtiveram 76 amostras positivas por Western blotting para detecção de anticorpos anti-*L. infantum*, destas 73 *buffy coats* foram avaliadas por PCR pelo sistema RV1/RV2, sendo nove positivas. Este resultado mostrou a importância de efetuar uma investigação para LV em doadores de sangue de área endêmica mas, revelou que, mesmo utilizando células mononucleares como amostra para a extração de DNA, a sensibilidade do sistema RV1/RV2 foi baixa em comparação com a sorologia.

Em 2002, Lachaud e colaboradores, avaliando dois métodos de PCR verificaram uma sensibilidade de 100% para o sistema RV1/RV2 em amostras de sangue periférico de cães doentes, o que motivou a utilização deste sistema pelo Serviço de Referência em Leishmanioses de Pernambuco.

Apesar de a PCR convencional ser sensível e específica, a ausência da capacidade quantitativa, ou uma maior dificuldade para realizar a quantificação, impede a diferenciação entre infecção e doença. Segundo Schalling e Oskam (2002), até 2001 havia apenas uma publicação referindo-se à utilização da PCR em tempo real como uma nova ferramenta para quantificação de *L. infantum*. Tal publicação é de autoria de Bretagne et al. (2001) sendo o primeiro trabalho a utilizar sonda TaqMan dirigida para o alvo de kDNA para quantificação do parasito no fígado de camundongos infectados. Esta publicação veio suprir a necessidade de desenvolvimento de uma técnica com capacidade quantitativa, uma vez que a recidiva da doença relaciona-se com a carga parasitária após o tratamento.

Diante da ausência de análise comparativa para o sistema RV1/RV2 e das vantagens atribuídas a qPCR, objetivou-se desenvolver e avaliar um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*, capaz de superar as dificuldades encontradas com as ferramentas diagnósticas disponíveis atualmente, com possibilidade de implantação nas rotinas de diagnóstico para LV.

1.4 Hipótese

Um sistema de detecção da infecção por *L. infantum*, baseado em PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para o complexo *L. donovani*, possuindo kDNA como região alvo, promove um diagnóstico seguro, podendo ser aplicado nas rotinas de diagnóstico para LV.

1.5 Objetivos

1.5.1 Geral

Desenvolver e avaliar um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães.

1.5.2 Específicos

- a) Alinhar seqüências de minicírculo de *Leishmania* spp para identificação de regiões alvo;
- b) Desenhar os *primers* e otimizar o sistema diagnóstico determinando o limite de detecção e a especificidade;
- d) Avaliar a sensibilidade e especificidade em amostras de sangue de cães infectados e não infectados;
- e) Comparar o sistema de PCR em tempo real com o PCR convencional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo

2.1.1 Amostragem

Foram utilizados cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos, domiciliados, provenientes do estado de Pernambuco - Brasil, amostrados por conveniência (REIS, 2003) totalizando 108 cães.

Os animais que participaram da pesquisa foram avaliados pela médica veterinária responsável pelo projeto. Os seus proprietários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e responderam a um questionário (Apêndice B/C) para identificação dos animais, dados sobre os proprietários e informações epidemiológicas e clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz - RJ (FIOCRUZ - RJ), recebendo parecer favorável (Protocolo n. 0241-05) (Anexo 1).

2.1.2 Definição de casos e controles

Foram considerados casos, animais com sinais clínicos, histórico epidemiológico compatível e testes parasitológicos (microscopia de punção de medula óssea e/ou raspados cutâneos) positivos e/ou animais com sinais clínicos, histórico epidemiológico compatível juntamente com ELISA positivo (Grupo 01). Foram considerados controles, cães que nunca habitaram em área endêmica, não receberam transfusão sanguínea e apresentaram testes sorológicos (IFI e ELISA) negativos (Grupo 02).

2.1.3 Coleta do material

Os animais foram submetidos ao exame físico, constando de inspeção da pele e fâneros além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos regionais. As observações foram adicionadas às fichas mencionadas no tópico 2, item 2.2.1. Em seguida, os animais foram contidos com mordanças de nylon adequadas para cada porte e, quando necessário, submetidos à sedação química, através da administração oral de acepromazina 0,2% na dosagem de 3 a 5 gotas por quilograma de peso.

2.1.3.1 Coleta de sangue

Após anti-sepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, foram coletados, de cada animal, 2 - 5 ml de sangue da veia cefálica, com auxílio de uma seringa de 5 ml acoplada a uma agulha 25x7 mm. Uma parte do material foi colocada diretamente em tubo de ensaio para formação do coágulo e remoção do soro para uso nos ensaios sorológicos. O restante da amostra foi armazenado em tubo contendo solução anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 ml de sangue) e estocado em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

2.1.3.2 Raspado cutâneo

Foram efetuados raspados de pele íntegra e/ou lesionada na região do focinho e orelhas, ou quaisquer outras áreas lesionadas, com o auxílio de lâmina de bisturi. Com o material obtido, foram confeccionados esfregaços em lâminas para microscopia.

2.1.3.3 Punção de medula óssea

Após o exame clínico, os animais com diagnóstico presuntivo de LVC, foram submetidos à medicação pré-anestésica por meio de aplicação subcutânea de 0,44 mg/kg de atropina, decorridos 15 minutos, a indução e manutenção anestésica ocorreram por meio de aplicação endovenosa de 1 - 2 mg/kg de xilazina 2% associada a 10 - 15 mg/kg de ketamina 10%. Com o animal anestesiado, após anti-sepsia, foi realizada punção na crista do osso esterno, utilizando-se seringa descartável (20 ml) acoplada a uma agulha 40x12 mm. Com o material obtido foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro.

2.1.4 Diagnóstico parasitológico

Os esfregaços confeccionados com os materiais obtidos nos raspados de pele e punção de medula óssea, após secarem, foram corados pelo método de Giemsa e examinados em microscópio óptico com objetiva de imersão.

2.1.5 Diagnostico sorológico

Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados através dos testes de IFI e ELISA.

ELISA - Foi utilizado o *kit* EIE-LVC produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, que utiliza placa de microtitulação sensibilizada com antígenos solúveis de *Leishmania major-like* (MHOM/BR/76/JOF) (LIRA,2005). A reação foi realizada, conforme o protocolo do fabricante.

IFI - Foi utilizado o *kit* IFI-LVC produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, que utiliza como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major-like* (MHOM/BR/76/JOF) (LIRA,2005). A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante.

2.1.6 Diagnóstico molecular

2.1.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi efetuada com o *kit* GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de duas maneiras: 1. de acordo com as recomendações do fabricante; 2. com adição de proteinase K (5 U/ml) e repetição da etapa de precipitação de proteína. O DNA extraído foi usado para avaliação do desempenho da PCR quantitativa em tempo real e PCR convencional.

2.1.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram realizadas duas reações de PCR:

- A. PCR quantitativa em tempo real - sistema desenvolvido;
- B. PCR convencional - sistema RV1/RV2 (FICHOUX et al., 1999), como descrito abaixo:

B1- Componentes da reação:

Água tipo I	14 µl
Tampão	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µl
dNTP 2 mM	2,5 µl
RV1 20 pmoles/µl	1,0 µl
RV2 20 pmoles/µl	1,0 µl
Taq DNA Polimerase	0,5 µl

Amostra de DNA controle positivo (*L. infantum*): 2,0 µl (0,1ng e 0,1pg) ou amostra a ser investigada 2,0 µl, resultando em volume final de 25 µl.

B2- Condições de ciclagem:

Desnaturação inicial	94°C/5 minutos
Desnaturação	94°C/30 segundos
Anelamento	67°C/1 minuto
Síntese	72°C/30 segundos
Síntese terminal	72°C/5 minutos
Número de ciclos:	35

2.1.7 Processamento do material

Os materiais coletados foram processados no Laboratório de Imunoparasitologia e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ.

2.2 Desenvolvimento do sistema baseado em PCR em tempo real

2.2.1 *Primers*

Com o auxílio do *software* Mega (versão 3.1) foi efetuado alinhamento múltiplo das seqüências do minicírculo das várias espécies de *Leishmania* disponíveis no banco de dados do BLAST - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e de *primers* para detecção do complexo *L. donovani* publicados até o momento (Figura 10).

Por meio da análise dos blocos CSB 1, CSB 2 e CSB 3, tomando como base a seqüência de número de acesso no NCBI Z35273.1 de *L. infantum* foi selecionada a região alvo. Com o auxílio do *software* Primer Express (Applied Biosystems, versão 2.0), foram desenhados *primers* para detecção das espécies do complexo *L. donovani*. Adicionando-se os *primers* no alinhamento constatou-se que, além da

detecção das espécies do complexo *L. donovani*, existiu a possibilidade de anelamento com *L. mexicana*, *L. major*, *L. lainsoni*, *L. tarentolae* e *L. amazonensis*.

DNA Sequences	
gi 514440 emb Z35273.1 L.infantum	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 609081 emb Z35501.1 L.infantum	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 514437 emb Z35271.1 L.infantum	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 514435 emb Z35276.1 L.chagasi	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 11493591 gb AF169132.1 L.chag.	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 2910981 emb Y11402.1 L.donovani	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 15193195 gb AF399822.1 L.donovani	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 159378 gb M87315.1 L.braziliensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
Z32842.1 GI:483460 L. major	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCATTTTT
gi 9858563 gb AF231100.1 L.braziliensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 159380 gb M87317.1 L.peruviana	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 159379 gb M87316.1 L.guyanensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 643466 gb U19811.1 L.panamensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 159377 gb M87314.1 L.V.panamensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 5359689 gb AF118467.1 L.pan.	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 5359682 gb AF118460.1 L.pan.	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 4585153 gb AF088235.1 L.lainsoni	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 4585152 gb AF088234.1 L.lainsoni	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 4585151 gb AF088233.1 L.lainsoni	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 159306 gb M94089.1 L.amazonensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 643465 gb U19810.1 L.amazonensis	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCATTTTT
gi 12604 emb Z11554.1 L.mexicana	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
gi 12603 emb Z11555.1 L.mexicana	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCATTTTT
gi 13092 emb X04110.1 L.tarentolae	T--GGGGC-GTTCGCG-AAAACCGAAAA-TGGGT-CCAGAAA-TCCCGTTCAAAAAT
T. cruzi whole genome NW 920449	AAACATGGGAAAGCGAAGAAATTTGAGCTTGTTCCTAGGCCCTTATGTTTCTGTTAT

Figura 10- Interface do *software* Mega (versão 3.1) mostrando parte do alinhamento de seqüências de DNA do minicírculo de *Leishmania* spp. Mesma cor representa similaridade entre as seqüências, cores diferentes significam divergência.

2.2.2 Sistemas de detecção

Por meio da combinação dos *primers*, foram criados sistemas de detecção. Para a escolha do melhor sistema, foi efetuado um experimento preliminar com o aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA, USA) (Figura 11) em condições padrões (recomendadas pelo fabricante), as quais são: temperatura de desnaturação 95 °C/15 s, anelamento e extensão 60 °C/1 min. Foi utilizado como padrão, 2 µl de DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) contendo 100 pg, 10 pg e 1 pg e controle negativo (amostra sem DNA). Para uma verificação inicial da especificidade, foram adicionados 100 pg de DNA genômico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). O volume final da reação foi de 50 µl contendo 5 pmoles de cada *primer* e 25 µl de *SYBR Green Master Mix* (Applied

Biosystems, CA, USA). Todas as amostras foram produzidas em duplicata. A reação foi efetuada com 40 ciclos.

Com a análise dos resultados do experimento preliminar, um sistema foi escolhido para ser otimizado. Por meio de modificações nas condições de ciclagem (temperaturas de anelamento e extensão: 58°C/30 s e 72°C/30 s; 60°C/30 s e 72°C/30 s, 62°C/1 min), bem como alterações na quantidade e concentração dos reagentes (3 pmol/ μ l de cada *primer*), foi definida a condição ótima de funcionamento do sistema de detecção escolhido.

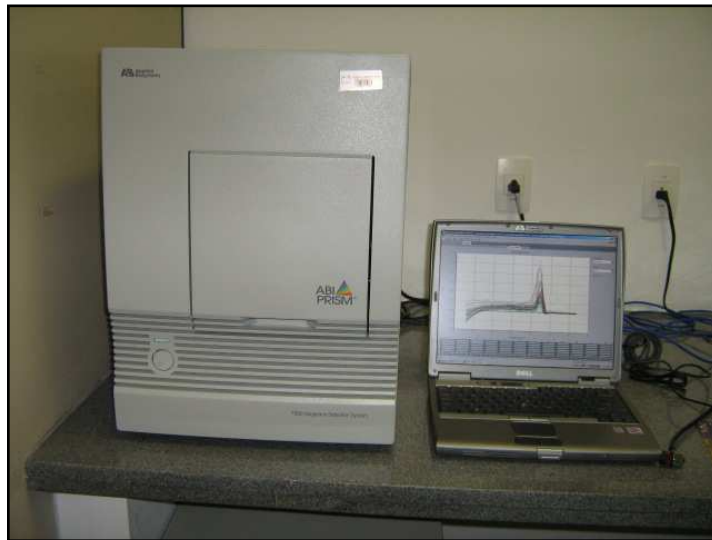


Figura 11- ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA, USA), conectado ao computador no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ.

2.2.3 Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade do sistema Linf 1B

2.2.3.1 Sensibilidade

Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP 75), nas concentrações de 0,01 fg a 1000 ng (7×10^{-5} a 7×10^6 parasitos).

A sensibilidade do ensaio foi definida pela amplificação da mais alta diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA (TOO, 2003).

Paralelamente, a sensibilidade também foi avaliada por meio do número de cópias do produto amplificado. Para tanto, produtos de PCR convencional foram purificados usando Sephaglas™ BanPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi dosado com marcador de massa (High DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Califórnia, USA) em eletroforese em gel de agarose a 0,8% e espectrofotometricamente, resultando em 0,66 ng/μl. A quantificação foi efetuada com o auxílio do site <http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/0107.html>, obtendo-se $4,6 \times 10^9$ moléculas alvo/μl. A partir da solução estoque foram obtidas soluções de uso (10^{-1} a 10^8 moléculas alvo/μl) que foram utilizadas como padrão alternativo para o qPCR.

2.2.3.2 Eficiência

Foi determinada de acordo com Too (2003), por meio da fórmula:

$$\varepsilon = (10^{1/\text{slope}}) - 1.$$

2.2.3.3 Especificidade

Para avaliação da especificidade utilizou-se DNA genômico de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), formas tripomastigotas e epimastigotas) (Tabela 2). As cepas de *Leishmania* spp foram cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ - RJ e Instituto Evandro Chagas - PA/Secretaria de Vigilância em Saúde - MS; a cepa Y de *T. cruzi* foi proveniente do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/FIOCRUZ - PE.

Tabela 2- Isolados de *Leishmania* spp e *T. cruzi* usados para verificar a especificidade do sistema de PCR em tempo real.

Espécies	Código OMS
<i>L. donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
<i>L. infantum</i>	MHOM/TN/1980/IPT1
<i>L. lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426
<i>L. amazonensis</i>	(IFLA/BR/1967/PH 8
<i>L. mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL 21
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. panamensis</i>	MHOM/PA/1971/L5 94
<i>L. major</i>	MRHO/SU/1959/P-strain
<i>L. tropica</i>	MHOM/SU/1958/Strain OD
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. naiffi</i>	MDAS/BR/1990/M5533
<i>L. shawi</i>	IWHI/BR/1999/M17904
<i>T. cruzi</i>	Cepa Y*

* Formas tripomastigota e epimastigota

A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1 + \varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde ε significa a eficiência da amplificação e ΔCt a diferença dos valores dos *Ct*s da amostra definida como alvo (*L. infantum*) e das amostras em teste (TOO, 2003).

2.2.4 Avaliação da reprodutibilidade

Para avaliação da reprodutibilidade do sistema, foi efetuada a análise inter-ensaio. Para tanto, *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) nas concentrações de 10 fg (7×10^{-2} parasitos) a 10 ng (7×10^4 parasitos) foram processadas em duplicata, sendo, o mesmo experimento, repetido cinco vezes.

2.3 Teste em amostras de sangue canino

O teste em amostras foi efetuado em dois aparelhos de PCR em tempo real; ABI Prism 7000 e ABI Prism 7500, do mesmo fabricante (Applied Biosystems, CA, USA), com as mesmas condições de ciclagem.

Canine Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) housekeeping genes foram usados como controle da qualidade das amostras. Para tanto, foi efetuada qPCR nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial 95°C/10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C/15 s, 60°C/50 s e 72°C/30 s. A reação foi composta por *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), 5 mM MgCl₂, 1 mM de cada *primer* 5'-CCAGAACATCATCCCTGCTT-3', e 5'-ACCACCTGGTCCTCAGTGT-3' (SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

2.3.1 Análise dos dados

A análise, interpretação e registro dos resultados dos testes em amostras de sangue de cães foram efetuados com o auxílio dos *softwares* ABI PRISM 7000 SDS (versão 1.1) e ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4). Quando necessário, também foi efetuada eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 mg/ml), usando marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA).

A análise estatística do qPCR (sistema Linf 1B) foi realizada por meio de regressão linear usando o Programa Microsoft Office Excel 2003; os intervalos de confiança foram gerados com o auxílio do Programa SPSS para o ambiente Windows 8.

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade do sistema Linf 1B foram calculados de acordo com Ferreira e Ávila (2001) utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste (Tabela 3).

Tabela 3 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiros positivos A	Falsos positivos B
Negativo	Falsos negativos C	Verdadeiros negativos D

Fonte- Ferreira; Ávila (2001).

A sensibilidade (S) do teste é dada pela porcentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes. A especificidade (E), pela porcentagem de negativos, entre indivíduos não doentes. Esses parâmetros foram determinados através das seguintes fórmulas:

$$S = \frac{A}{A + C} \qquad E = \frac{D}{B + D}$$

A comparação entre os testes diagnósticos (qPCR e PCR convencional) foi realizada pela análise dos intervalos de confiança gerados com o auxílio do Programa Epi Info 6.04 com 95% de confiança e por meio do teste de Qui-quadrado (χ^2) efetuado no Programa Epi Info 3.32.

3 RESULTADOS

3.1 Região alvo e desenho dos *primers*

Tendo como base a seqüência NCBI Z35273.1 de *L. infantum*, a análise do alinhamento múltiplo demonstrou região conservada para o complexo *L. donovani* envolvendo os blocos CSB1, CSB2 e CSB3, com seqüências de bases diferentes para outras espécies de *Leishmania*, como por exemplo: *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Foram desenhados cinco *primers* nesta região (Tabela 4), visando capacidade de anelamento apenas nas espécies causadoras da LV.

Tabela 4- Característica dos *primers* desenhados para desenvolvimento de um sistema baseado em PCR em tempo real para detecção da infecção por *Leishmania infantum*.

Identificação	Seqüência	Tamanho	%CG	T_m °C
114-Linf1 23F	5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3'	20 bases	45	55
115-Linf1 94R	5'- GAACGGGATTTCTGCACCC-3'	19 bases	58	59
116-Linf1 154R	5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3'	20 bases	50	56
117-Linf2 71F	5'-AAAATGGGTGCAGAAATCC-3'	19 bases	42	54
118-Linf2 150R	5'-ACCAACCCCCAGTTTCCC-3'	18 bases	61	58

Legenda- T_m: *melting temperature*

3.2 Sistemas de detecção

Por meio da combinação dos *primers* foram criados três conjuntos de diagnóstico ou sistemas de detecção (Tabela 5).

Tabela 5- Sistemas de detecção formados por combinação dos *primers* desenhados para diagnóstico da infecção por *L. infantum*.

Identificação do sistema	Primers	Produto amplificado	
		Tamanho	<i>T_m</i> °C
Linf 1 A	114-Linf1 23F x 115-Linf 1 94R	72 pb	77,4
Linf 1 B	114-Linf1 23F x 116-Linf.1154R	132 pb	81
Linf 2	117-Linf2 71F x 118-Linf2 150R	80 pb	79,5

Legenda- pb: pares de base; *T_m*: *melting temperature*

A escolha do melhor sistema foi baseada na análise do experimento preliminar descrito no tópico 2, item 2.2.2, cujo os resultados estão apresentados a seguir.

Pode-se observar que o sistema Linf 1A apresentou padrões com comportamento esperado, NTC atingindo o *Threshold* e presença de dímeros com *T_m* facilmente distinguível da amostra alvo. O teste de especificidade demonstrou o mesmo comportamento do NTC, com amplificações atingindo o *C_t* e apresentando pico com *T_m* diferente do alvo (Figura 12). Para o sistema Linf 1B, observou-se padrões com alta sensibilidade, dímero muito pequeno em uma das duplicatas do NTC, representando, possivelmente, excesso de *primer* e, teste de especificidade com uma excelente performance (Figura 13).

O sistema Linf 2, apesar do bom desempenho para NTC e teste de especificidade, não apresentou um comportamento adequado para os padrões, ou seja, os valores de *C_t* para cada amostra, não acompanharam as diluições seriadas do DNA alvo (Figura 14).

De modo geral, a análise em gel confirmou a interpretação dos gráficos do qPCR.

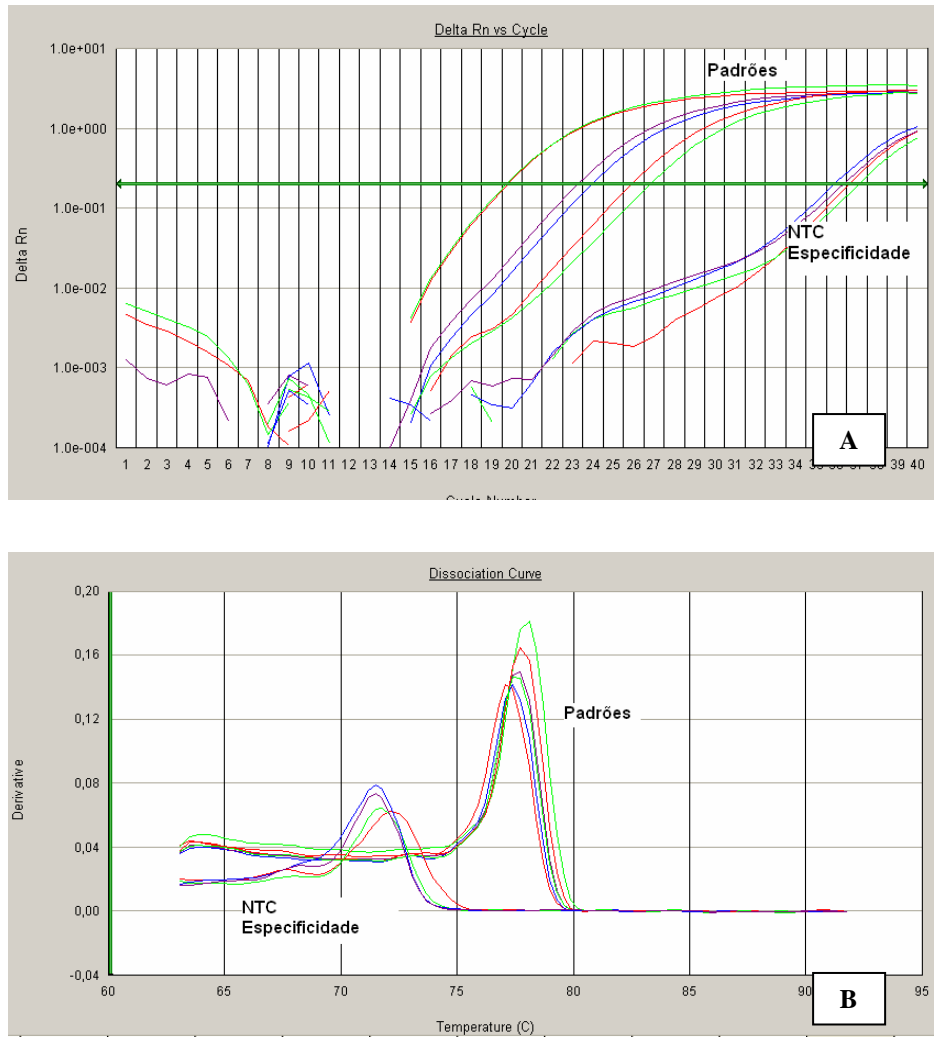


Figura 12- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do sistema Linf 1A mostrando boa performance para os padrões. NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* -100 pg) com amplificação e formação de dímeros com T_m diferente do alvo.

Legenda- NTC: controle negativo; T_m : melting temperature.

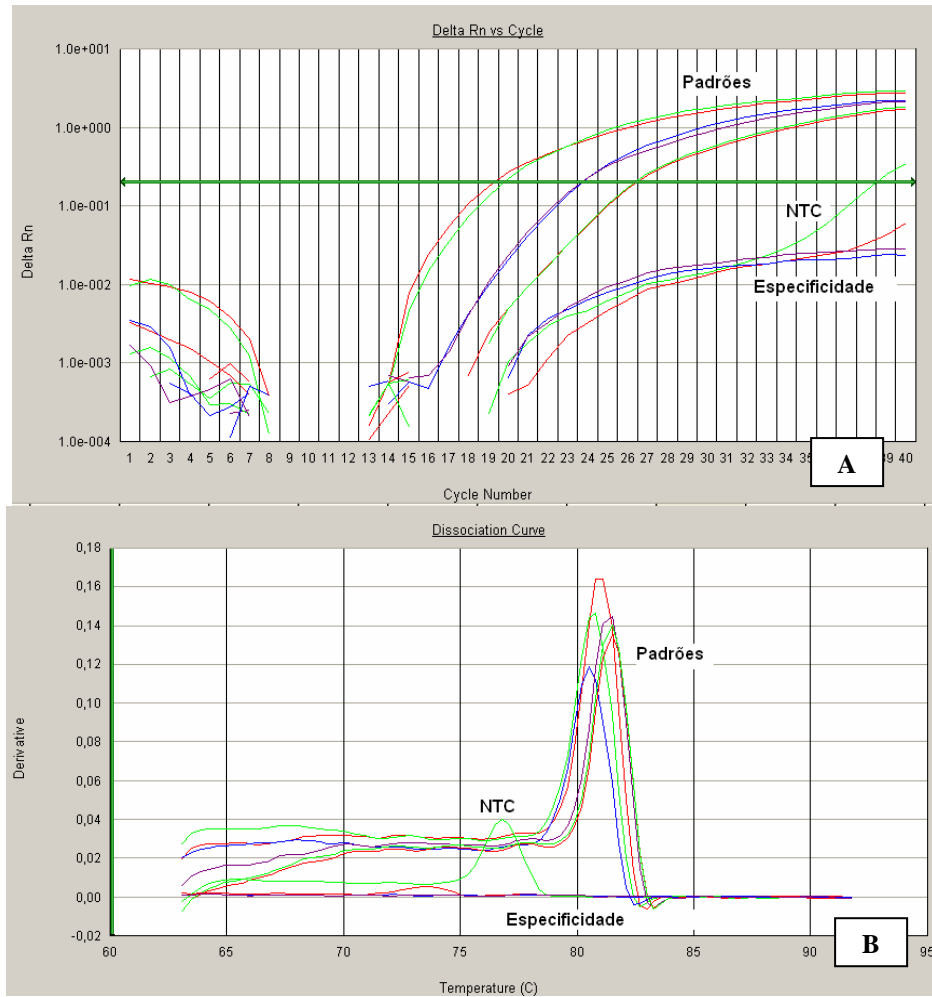


Figura 13- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do sistema Linf 1B mostrando boa performance para os padrões, NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* -100 pg).
 Legenda- NTC: controle negativo.

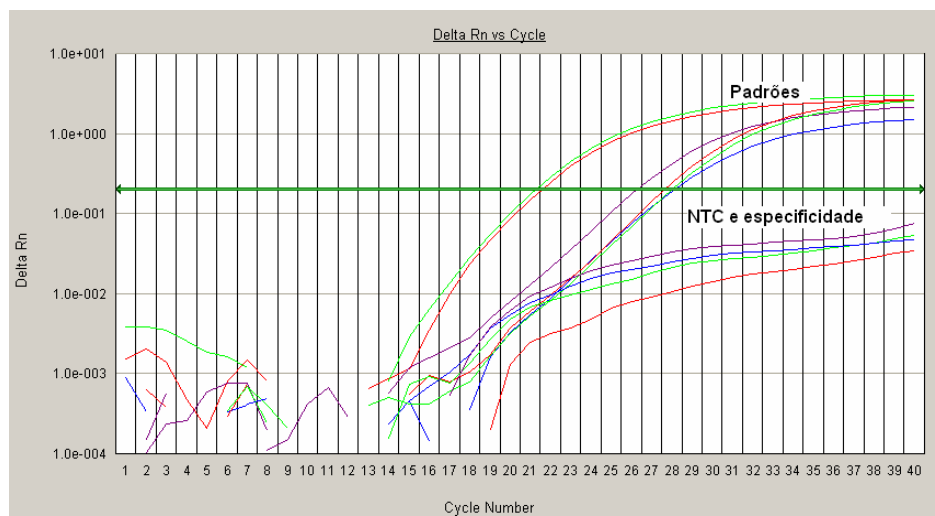


Figura 14- Curva de amplificação do sistema Linf 2 mostrando boa performance para NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* -100 pg) porém, padrões com comportamento não esperado.
 Legenda- NTC: controle negativo.

De acordo com as observações citadas anteriormente, os três sistemas criados possuem capacidade para serem otimizados e aplicados para o diagnóstico da LV. Como o Linf 1B apresentou o melhor desempenho, foi selecionado para aplicação em amostras de sangue.

3.3 Otimização do sistema Linf 1B

A Tabela 6 mostra um resumo do processo de otimização do sistema Linf 1B.

Tabela 6- Alterações de temperaturas de anelamento e extensão para otimização do sistema Linf 1B, experimentos realizados com 40 ciclos.

Condições de ciclagem		Resultado	Conclusão
Desnaturação	Anelamento e extensão		
95°C/15 s	58°C/30 s 72°C/30 s	Dímero de ≈ 70 pb nos padrões e teste de especificidade. Teste de especificidade com pico pequeno, mas com a mesma T_m do alvo.	Sistema perdeu em especificidade. Aumentar temperatura de anelamento.
95°C/15 s	60°C/30 s 72°C/30 s	Não houve a formação de picos específicos. Teste de especificidade atingindo o C_t .	Perda tanto de especificidade como de sensibilidade. Testar uma única temperatura para anelamento e extensão.
95°C/15 s	62°C/1 min	Teste de especificidade com amplificação e pico semelhante ao alvo.	Perda de especificidade. Voltar às condições padrões.

Legenda- pb: pares de base; C_t : ciclo *threshold*; T_m : *melting temperature*

A análise dos três experimentos mostra que as melhores condições de funcionamento para o sistema Linf 1B são as condições padrões do aparelho, ou seja, 95°C/15 s e 60°C/1 min, pois, cada alteração na temperatura levou a perdas de sensibilidade e/ou especificidade (Tabela 6).

Um novo experimento efetuado nas condições padrões do aparelho e com redução na concentração dos *primers* (3 pmoles/ μ l), mostrou uma excelente detecção, tanto no PCR em tempo real (Figura 15) como na análise em gel (Figura 16), as amostras correspondentes a 1 fg foram detectadas. O dímero observado no

NTC, em experimento inicial para a escolha do melhor sistema, não foi evidenciado, porém, o teste de especificidade apresentou amplificação com T_m facilmente distinguível do alvo, não sendo visualizada banda na análise em gel (Figuras 15 e 16).

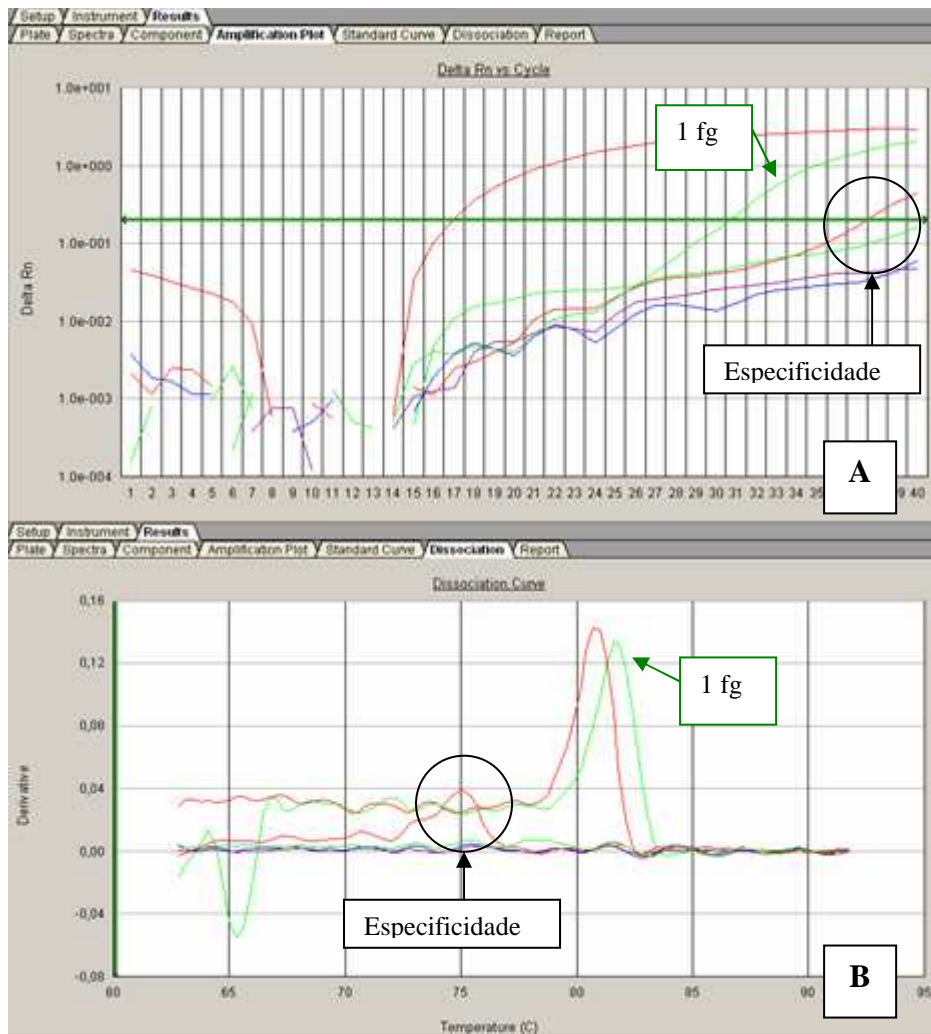


Figura 15- Curvas de amplificação (A) e dissociação (B) do primeiro experimento de avaliação do limite de detecção. A linha verde mostra a boa performance do sistema em detectar até 1 fg de DNA genômico de *L. infantum*. No teste de especificidade (*L. braziliensis* -100 pg) observa-se a formação de pico correspondente a amplicon com $T_m = 75^\circ\text{C}$ de um fragmento de aproximadamente 70 pb.

Legenda- pb: pares de base; T_m : melting temperature.

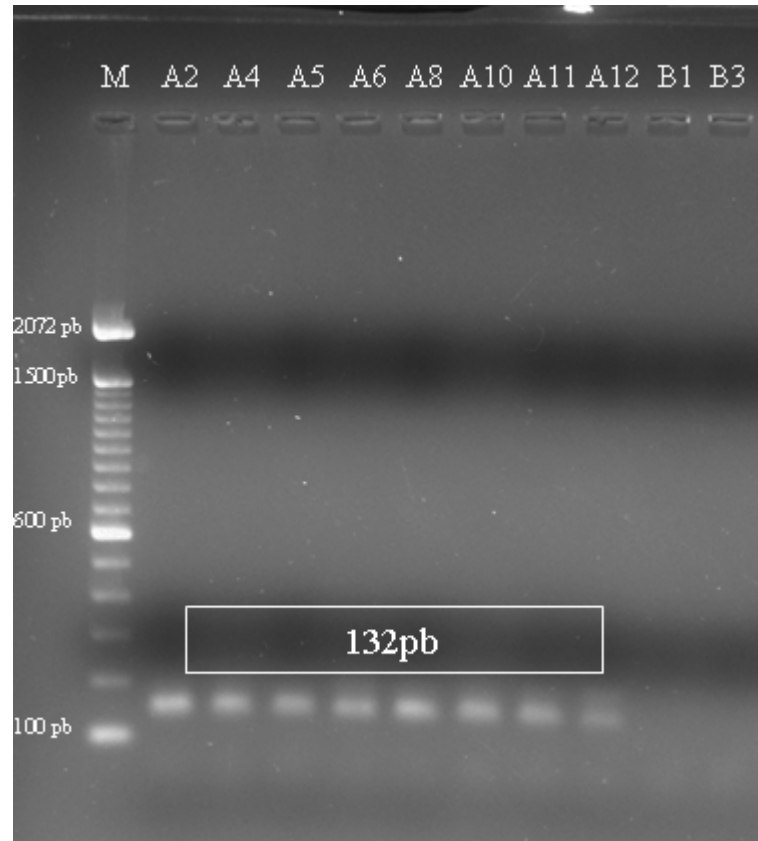


Figura 16- Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando bandas específicas para *L. infantum* com 132 pb, ausência de bandas no NTC e teste de especificidade (*L. braziliensis* -100 pg).

Legenda- A2 a A12-padrão *L. infantum* (0,1 ng a 1 fg), B1: NTC (controle negativo), B3: teste de especificidade (*L. braziliensis* 100 pg); pb: pares de base; M: marcador de peso molecular.

3.4 Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade do sistema Linf 1B

3.4.1 Sensibilidade e eficiência

Para a avaliação da sensibilidade foram realizados cinco experimentos, como descrito no tópico 2, item 2.1.4, resultando num limite de detecção de 10 fg de DNA genômico de *L. infantum* (7×10^{-2} parasitos). A faixa ótima de funcionamento do sistema foi de 10 fg a 10 ng, o equivalente a 7×10^{-2} a 7×10^4 parasitos/reação.

Para a reprodutibilidade, de acordo com a análise efetuada por meio da regressão linear e intervalos de confiança, não houve diferença significativa entre os ensaios (Figura 17).

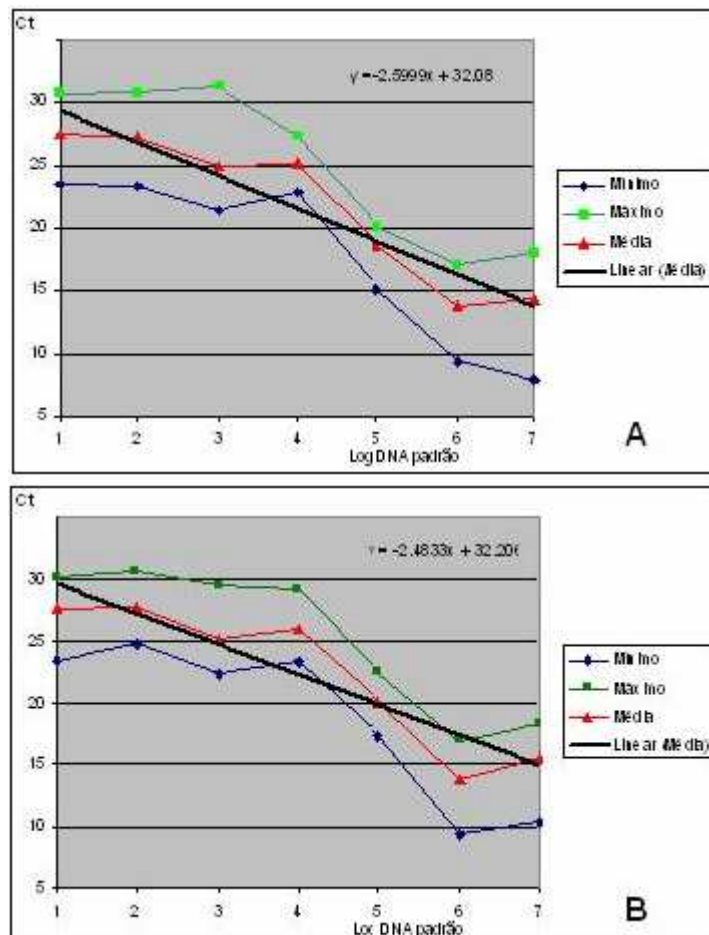


Figura 17- Análise linear dos valores mínimo, máximo e média dos Cts do logaritmo de cada concentração de DNA padrão. A: amostras; B: duplicatas. A análise das equações A ($y = -2.5999x + 32.08$), B ($y = -2.4833x + 32.206$) e intervalos de confiança (A: $B_0 = 27,25; 36,91$ $B_1 = -3,7; -1,5$ B: $B_0 = 26,81; 37,61$ $B_1 = -3,7; -1,3$), mostram não haver diferença significativa entre os ensaios.

A curva-padrão foi construída, mantendo-se linear em sete logaritmos da concentração de DNA padrão, com coeficiente de correlação de 93% e eficiência da reação de 94% ($R^2 = 0.931$, $\epsilon = 0.9417$ e slope = -3.47) (Figura 18), confirmando a boa performance do sistema para a detecção de DNA de *L. infantum*.

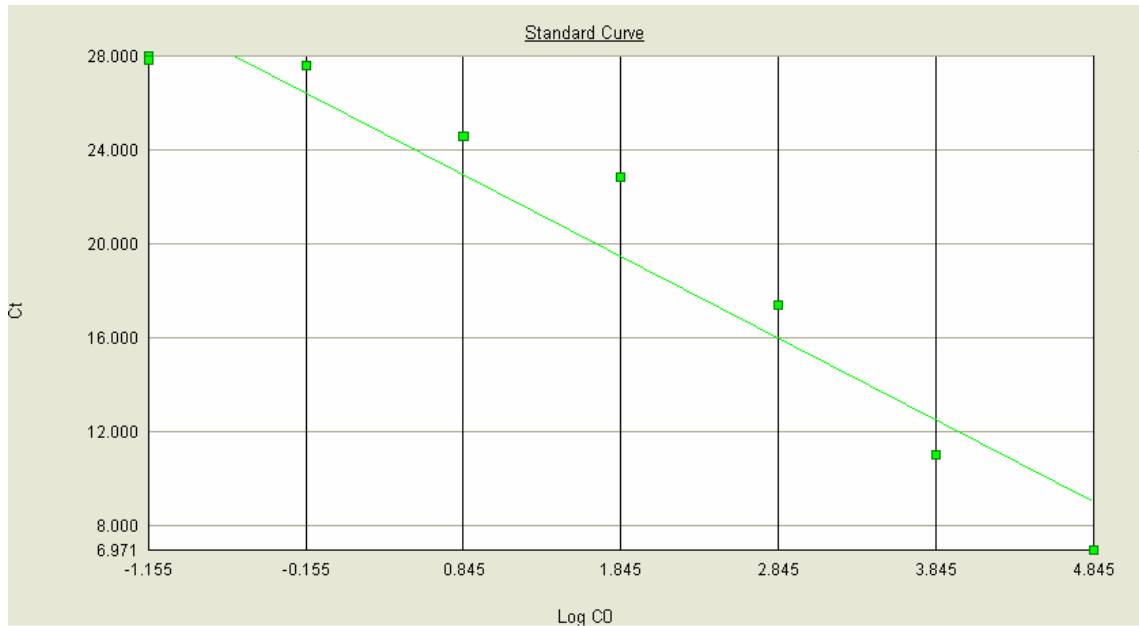


Figura 18- Interface do software ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4) mostrando a curva padrão do Log da concentração de DNA de *L. infantum*. A concentração de DNA variou de 10 fg a 10^7 fg/reação, atingindo os *Ct*s nos seguintes valores: 10^7 fg *Ct*= 6.97, 10^6 fg *Ct*= 10.99, 10^5 fg *Ct*= 17.41, 10^4 fg *Ct*= 22.81, 10^3 fg *Ct*= 24.58, 10^2 fg *Ct*= 27.58, 10 fg *Ct*= 28.00. $R^2= 0.931$ e slope= -3.47.

Em relação ao uso do produto amplificado como padrão alternativo, o sistema foi capaz de detectar entre 10 e 100 cópias do DNA alvo/reação.

3.4.2 Especificidade

De acordo com o alinhamento das seqüências de minicírculos de *Leishmania* spp, além das espécies do complexo *L. donovani*, esperava-se o reconhecimento das seguintes espécies: *L. mexicana*, *L. major*, *L. lainsoni*, *L. tarentolae* e *L. amazonensis*.

Para uma amostra ser enquadrada como positiva, foram definidos quatro critérios:

- duplicatas homogêneas;
- curva de amplificação - *Ct* inferior ao NTC;
- curva de dissociação - derivativa superior ao NTC;
- espectro e componente adequados.

Levando-se em consideração os critérios de positividade, houve amplificação de 50 pg/μl de *L. donovani* ($Ct= 19,85$; $\sigma = 3,10$), *L. major* ($Ct= 24,77$; $\sigma = 80,87$) e *L. mexicana* ($Ct= 26,74$; $\sigma = 298,88$) (Figura 19). Desta forma, analisando o Log de σ , o sistema é $10^{0,5}$, $10^{1,9}$ e $10^{2,5}$ vezes mais específico para o DNA alvo (*L. infantum*), do que as demais espécies reconhecidas, respectivamente. Outros isolados de *Leishmania* e *T. cruzi* (Tabela 2) não se enquadraram nos critérios de positividade. A análise em gel confirmou os resultados (Figura 20).

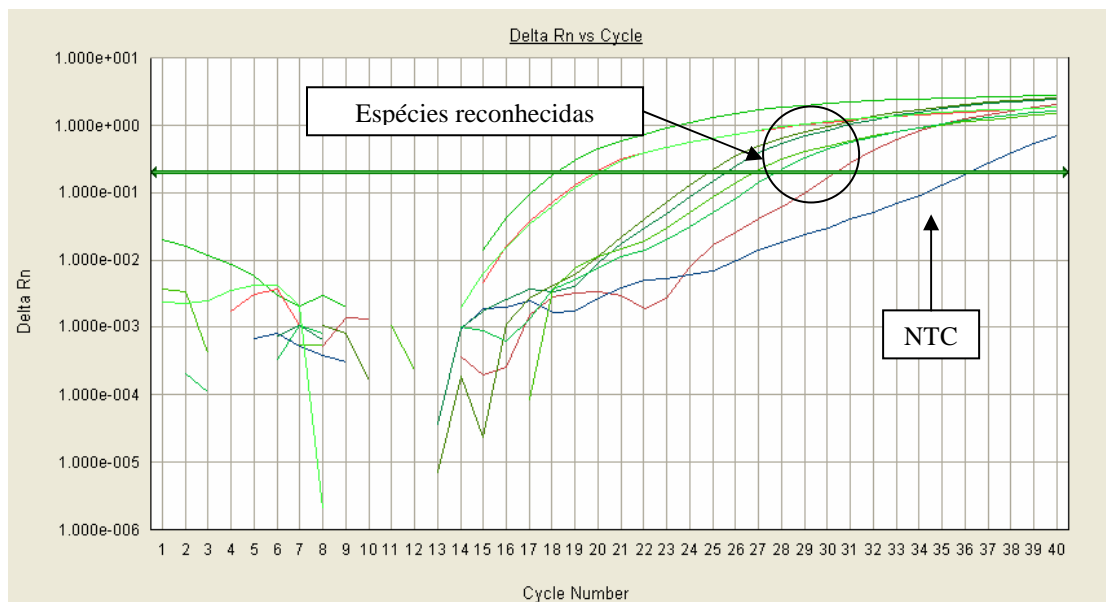


Figura 19- Curva de amplificação mostrando as espécies reconhecidas pelo sistema Linf 1B. *L. infantum* (alvo) $Ct= 18,15$; *L. major* $Ct= 24,77$; *L. mexicana* $Ct= 26,74$; *L. donovani* $Ct= 19,85$. NTC (controle negativo) $Ct= 35,68$.

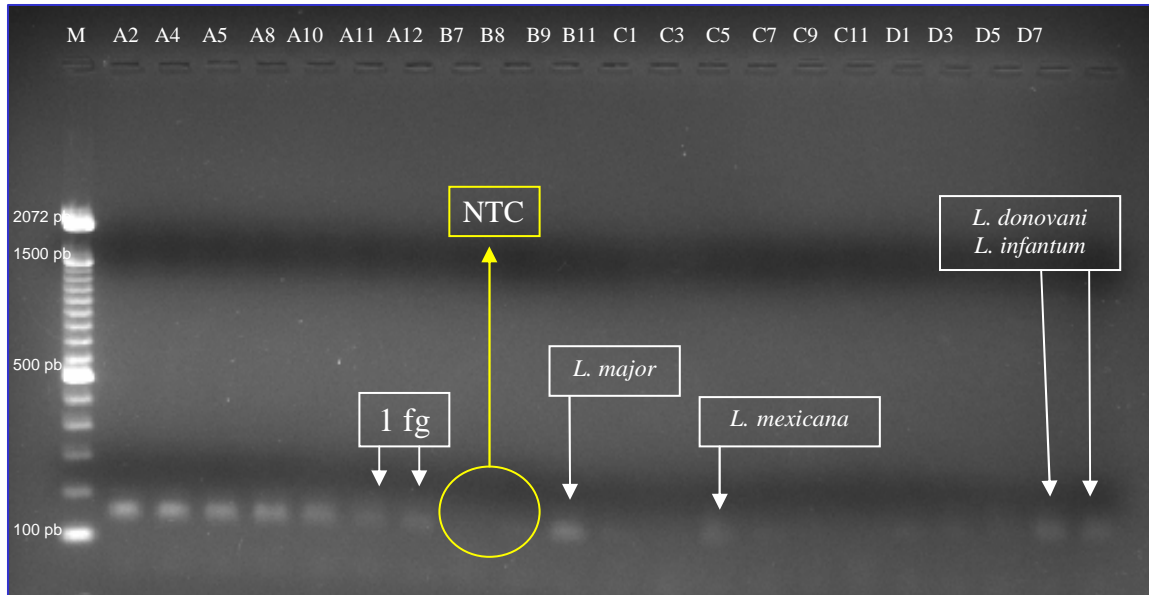


Figura 20- Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando bandas específicas para *L. infantum* com 132 pb até o limite de 1 fg de DNA padrão, ausência de bandas no NTC. Teste de especificidade com reconhecimento das espécies do complexo *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana*.

Legenda- A2 a A12-padrão *L. infantum* (100 pg a 1 fg), B7/B8: NTC (controle negativo), B9 a D7: teste de especificidade. pb: pares de base; M: marcador de peso molecular.

3.5 Avaliação do desempenho do sistema Linf 1B em amostras de sangue

Dos 108 animais incluídos no estudo, 66 apresentaram diagnóstico presuntivo de LVC, destes, apenas 21 apresentaram os parâmetros para serem incluídos nos critérios de caso (Grupo 01) (Tabela 7), 42 cães foram definidos como controles negativos (Grupo 02).

Tabela 7- Resultados dos exames para os animais classificados como casos.

Caso	Identificação	Resultados	
		Parasitológico	ELISA
01	11	positivo	positivo
02	21	positivo	positivo
03	22	positivo	positivo
04	28	positivo	positivo
05	29	positivo	positivo
06	35	positivo	positivo
07	44	positivo	positivo
08	55	negativo	positivo
09	54	positivo	positivo
10	57	positivo	positivo
11	39	positivo	negativo
12	58	positivo	-
13	5L	positivo	negativo
14	8L	-	positivo
15	11L	positivo	negativo
16	12L	positivo	negativo
17	13L	positivo	negativo
18	16L	positivo	positivo
19	22L	positivo	negativo
20	23L	-	positivo
21	56	negativo	positivo

Legenda: - exame não realizado

A extração de DNA de sangue efetuada de acordo com as recomendações do fabricante do *Kit* não foi eficaz; o sistema não foi capaz de distinguir entre casos e controles. Desta forma, foram efetuadas duas alterações no protocolo de extração: 1) adição de proteinase K (5 U/ml) e 2) repetição da etapa de precipitação de proteína, as quais se mostraram suficientes para superar as dificuldades encontradas na interpretação dos resultados.

A análise dos experimentos com amostras de sangue foi realizada levando-se em consideração os critérios definidos no item 3, tópico 3.4.2, sendo considerada positiva a amostra com confirmação dos quatro parâmetros; três parâmetros, amostra classificada como duvidosa e, menos de três parâmetros, amostra negativa (Apêndice D).

Todas as amostras (casos e controles) foram positivas para GAPDH qPCR (Tabela 8). Todos os cães classificados como casos foram positivos para o qPCR pelo sistema Linf 1B (Figuras 21/22), apresentando uma sensibilidade de 100% (Tabela 9).

Tabela 8 - Número de ciclos necessários para atingir o *threshold* por amostra estudada em reação de GAPDH qPCR.

Casos	Cts	Controles	Cts
01	25.00	01	30.21
02	22.37	02	24.70
03	23.49	03	26.57
04	21.42	04	29.08
05	21.96	05	30.35
06	24.13	06	30.45
07	24.70	07	30.83
08	23.04	08	22.06
09	27.45	09	29.30
10	23.43	10	25.52
11	21.96	11	30.36
12	23.06	12	28.79
13	28.18	-	-
14	24.57	-	-
15	28.59	-	-
16	29.05	-	-
17	25.35	-	-
18	27.18	-	-
19	26.33	-	-
20	26.35	-	-
21	24.40	-	-

Legenda: - ausência de amostra; Cts: ciclos *threshold*

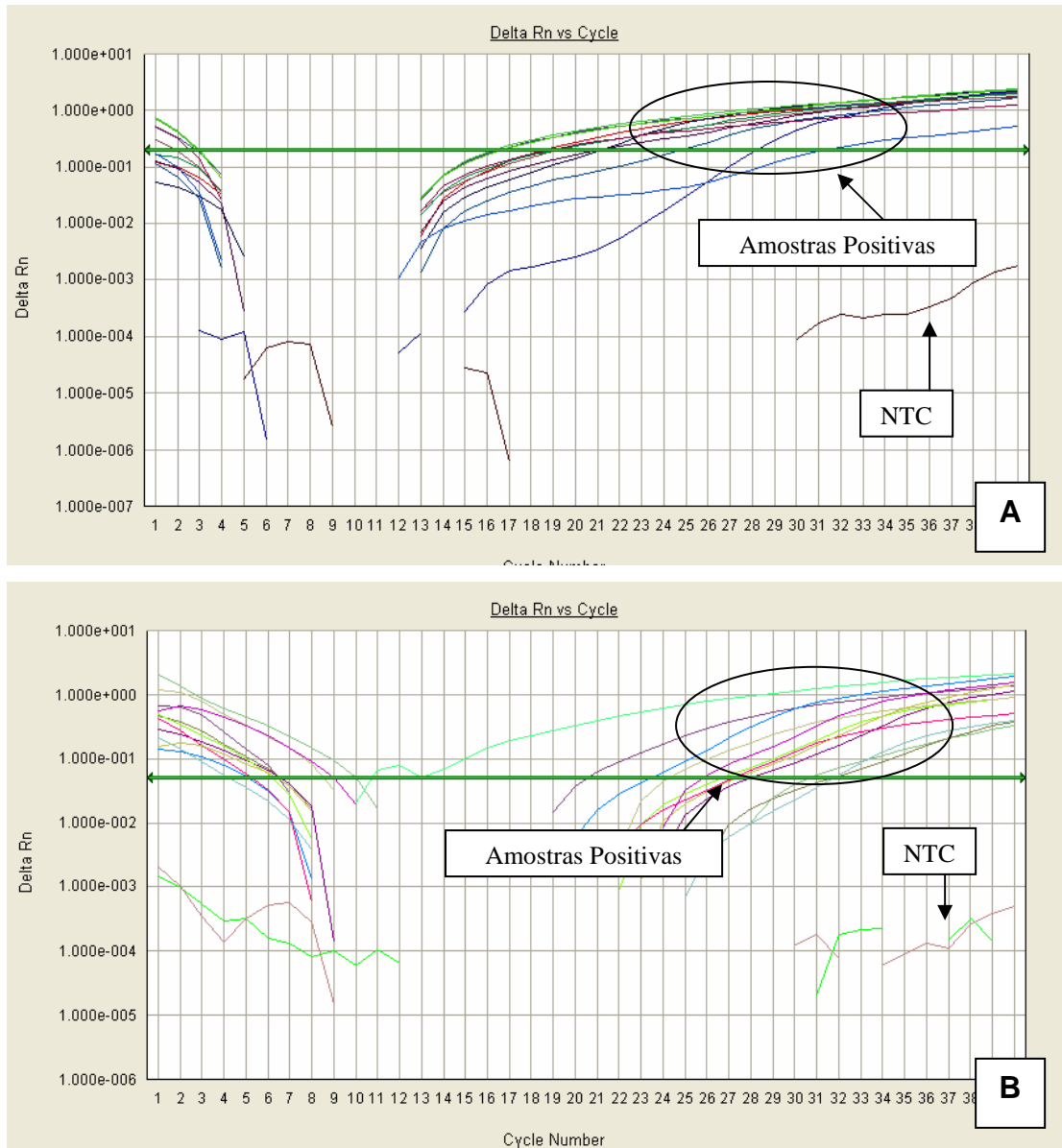


Figura 21- Curva de amplificação apresentando amostras de 01 a 10 (A) e 11 a 21 (B), positivas pelo sistema Linf 1B. DNA padrão (A) (10 ng) $C_t= 18.60$; caso 01 $C_t= 21.11$; caso 02 $C_t= 16.31$; caso 03 $C_t= 19.3$; caso 04 $C_t= 16.56$; caso 05 $C_t= 21.09$; caso 06 $C_t= 24.78$; caso 07 $C_t= 19.15$; caso 08 $C_t= 18.85$; caso 09 $C_t= 31.25$; caso 10 $C_t= 16.64$; DNA padrão (B) (10 ng) $C_t= 10.61$; caso 11 $C_t= 30.52$; caso 12 $C_t= 20.46$; caso 13 $C_t= 31.56$; caso 14 $C_t= 27.89$; caso 15 $C_t= 23.33$; caso 16 $C_t= 26.54$; caso 17 $C_t= 27.15$; caso 18 $C_t= 31.66$; caso 19 $C_t= 24.20$; caso 20 $C_t= 27.24$; caso 21 $C_t= 25.68$, NTC (controle negativo) $C_t=$ indetectável.

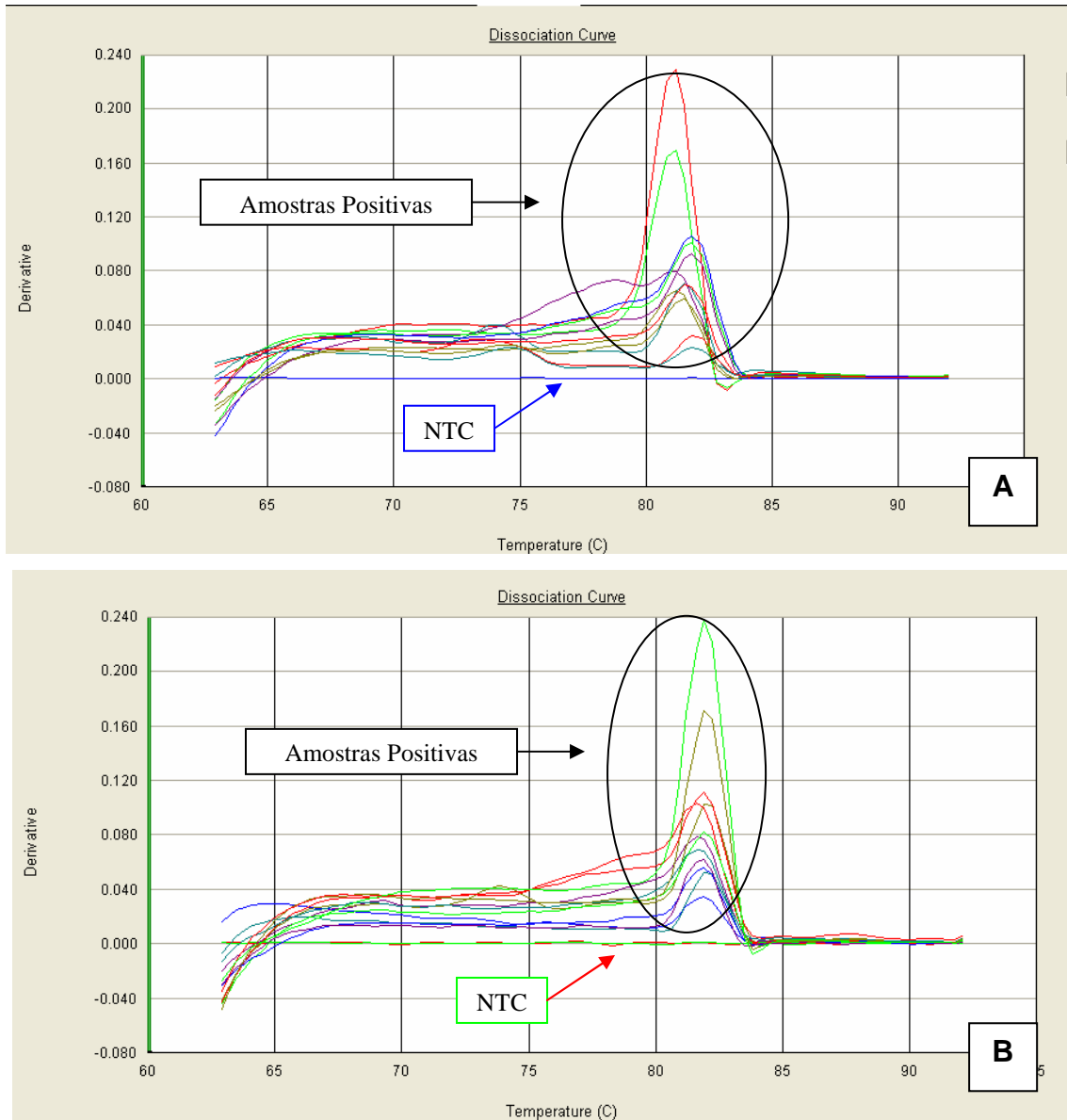


Figura 22- Curva de dissociação apresentando amostras de 01 a 10 (A) e 11 a 21 (B), positivas pelo sistema Linf 1B.
 Legenda- NTC: controle negativo.

Tabela 9 - Combinação binária entre os resultados obtidos pelo PCR em tempo real (sistema Linf 1B) e o diagnóstico verdadeiro da LVC.

qPCR	Padrão-ouro (LVC)	
	Presente	Ausente
Positivo	21	2
Negativo	0	10

Legenda- qPCR: PCR em tempo real; LVC: leishmaniose visceral canina

A carga parasitária foi quantificada em todas as amostras positivas, variando de 31×10^{-5} a 11×10^5 parasitos/reação (Tabela 10). Com relação ao controle (Grupo 02), houve contaminação em 30 amostras, dos 12 cães restantes, 10 foram negativos e 02 positivos, desta forma, a especificidade do sistema Linf 1B foi de 83.33% (Tabela 9). Nas amostras controles consideradas positivas, a quantificação revelou presença de 6×10^{-3} e 2×10^{-4} parasitos/reação.

Tabela 10- Carga parasitária e o número de ciclos necessários para atingir o *threshold* por amostra estudada.

Casos	Cts	Quantidade de parasitos / amostra	Controles	Cts	Quantidade de parasitos / amostra
01	21.11	340,5	01	33.33	2×10^{-5}
02	16.31	76×10^4	02	39.63	2×10^{-8}
03	19.3	18×10^3	03	indetectável	Indetectável
04	16.56	62×10^4	04	37.89	10^{-7}
05	21.09	186,8	05	indetectável	Indetectável
06	24.78	10,3	06	indetectável	Indetectável
07	19.15	22×10^3	07	34.51	2×10^{-6}
08	18.85	715,5	08	indetectável	Indetectável
09	31.25	31×10^{-5}	09	33.69	10^{-5}
10	16.64	11×10^5	10	36.17	10^{-6}
11	30.52	4×10^{-4}	11	28.47	6×10^{-3}
12	20.46	20,35	12	31.22	2×10^{-4}
13	31.56	12×10^{-5}	-	-	-
14	27.89	7×10^{-3}	-	-	-
15	23.33	0,9	-	-	-
16	26.54	2×10^{-2}	-	-	-
17	27.15	0,01	-	-	-
18	31.66	12×10^{-5}	-	-	-
19	24.20	0,36	-	-	-
20	27.24	0,01	-	-	-
21	25.68	11	-	-	-

Legenda: - ausência de amostra; Cts: ciclos *threshold*

3.6 PCR convencional

Dos 21 animais considerados casos, apenas cinco (casos número 1, 5, 6, 7 e 12) foram positivos na PCR convencional pelo sistema RV1/RV2 (Figura 23), apresentando sensibilidade de 23,80% (Tabela 11). Em relação aos controles, os 12 cães foram negativos, sendo calculada uma especificidade de 100% (Tabela 11) (Figura 24).

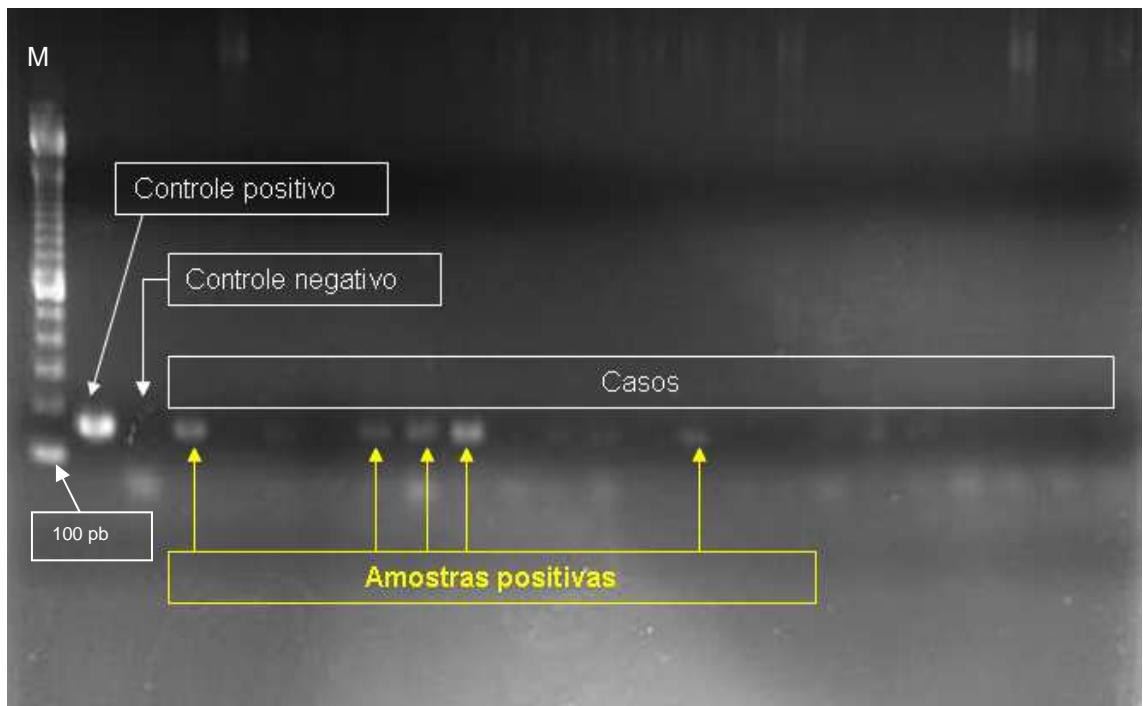


Figura 23- Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR convencional usando os *primers* RV1 e RV2 para as amostras positivas. Das 21 amostras consideradas casos, apenas cinco apresentaram banda específica de 145 pb.

Legenda- M: marcador de peso molecular; pb: pares de base.

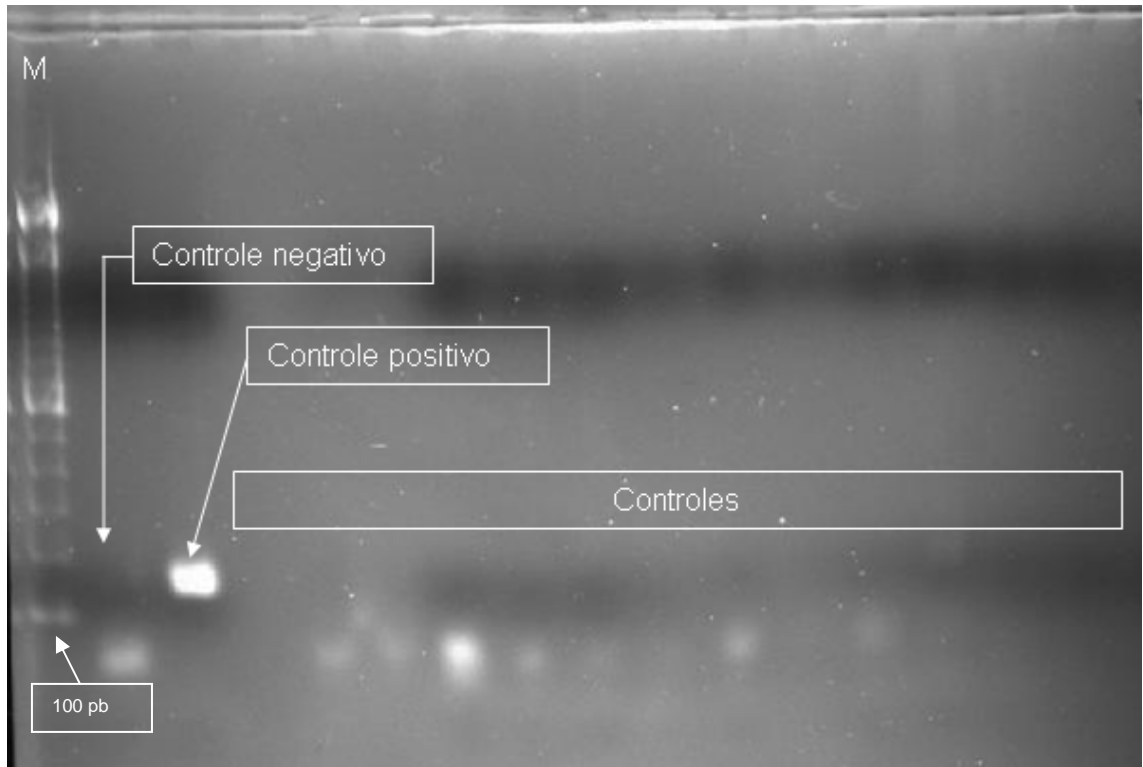


Figura 24- Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da PCR convencional usando os *primers* RV1 e RV2 para as amostras negativas. As 12 amostras consideradas controles não apresentaram amplificação específica para banda de 145 pb.

Legenda- M: marcador de peso molecular; pb: pares de base.

Tabela 11 - Combinação binária entre os resultados obtidos pelo PCR convencional (sistema RV1/RV2) e o diagnóstico verdadeiro da LVC.

PCR	Padrão-ouro (LVC)	
	Presente	Ausente
Positivo	5	0
Negativo	16	12

Legenda- LVC: leishmaniose visceral canina

3.7 Análise comparativa entre os sistemas Linf 1B (qPCR) e RV1/RV2 (PCR convencional)

A análise comparativa entre os testes diagnósticos está representada na Tabela 12.

Tabela 12- Análise comparativa entre os sistemas Linf 1B e RV1/RV2 baseados em qPCR e PCR convencional, respectivamente.

	Sensibilidade	IC sensibilidade	Especificidade	IC especificidade
qPCR	100%	80,8 %– 100%	83,3%	50,9 %– 97,1%
PCR	23,8%	9,1% – 47,6%	100%	69,9 %- 100%

Legenda- IC: intervalo de confiança

A análise por meio dos intervalos de confiança mostra uma diferença significativa entre os testes em relação à sensibilidade porém, não foi evidenciada diferença ao se analisar a especificidade.

O Teste de Qui-quadrado (χ^2) confirmou a análise efetuada por meio dos IC (Tabela 13).

Tabela 13: Resultado do Teste Qui-quadrado (χ^2) para comparação das proporções de sensibilidade e especificidade dos sistemas de PCR em tempo real (Linf 1B) e PCR convencional (RV1/RV2).

Sensibilidade		Especificidade	
χ^2	25,85	χ^2 (Yates)	0,55
GL	1	GL	1
p	0,001	p	0,46

Legenda- GL: grau de liberdade;
p: significância estatística

4 DISCUSSÃO

O MS preconiza que o diagnóstico da LVC seja realizado por meio das provas sorológicas (IFI e ELISA) (BRASIL, 2004). Em estudo para avaliar a performance de dois *kits* de diagnósticos utilizados pelo MS, Lira et al. (2006) observaram sensibilidades de 68% e 72% para IFI e ELISA, respectivamente e, especificidade de 87,5% para os dois métodos. Com o objetivo de melhorar a sensibilidade, os testes foram associados em paralelo obtendo-se 92% de sensibilidade e 75% de especificidade, havendo reação cruzada com demodicose. Com estes resultados concluiu-se que, em pesquisas epidemiológicas, os testes devem ser associados, levando-se em consideração as vantagens e limitações das provas sorológicas.

A literatura mundial aponta para a ausência de um padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* (IKONOMOPOULOS et al., 2003; WILSON, 1995). Desta forma, na tentativa de contribuir para um diagnóstico seguro da LV e superar das dificuldades encontradas com os métodos tradicionais desenvolveu-se um sistema baseado em PCR em tempo real, o qual será discutido a seguir.

No presente estudo, a análise por meio do alinhamento múltiplo das seqüências das várias espécies de *Leishmania* disponíveis nos bancos de dados de domínio público foi essencial para escolha da região alvo. Às observações registradas por Ntambi e Englund, (1985), Ray, (1989), Rodriguez et al. (2000) e Lambson e Barker, (2002) caracterizando os blocos CSB1, CSB2 e CSB3 como regiões superconservadas favoreceu a escolha da região alvo uma vez que, os blocos estão presentes em todos os tripanosomatídeos (LAMBSON; BARKER, 2002) apresentando variações gênero, espécie ou isolados-específicas (ROGERS; WIRTH, 1987).

A comparação com *primers* já descritos, inclusos no alinhamento para verificação da similaridade, garantiu o desenvolvimento de um sistema inédito de detecção da infecção por *L. infantum*. Adicionando-se os *primers* desenhados no alinhamento, constatou-se que, além da detecção das espécies do complexo *L. donovani*, existiu a possibilidade de anelamento com *L. mexicana*, *L. major*, *L. lainsoni*, *L. tarentolae* e *L. amazonensis*, a qual foi parcialmente confirmada pelo teste de especificidade do sistema de PCR em tempo real desenvolvido.

A combinação dos *primers* Linf1 23F, Linf1 94R, Linf1 154R, Linf2 71F e Linf2 150R gerou três sistemas de detecção (Linf 1A, Linf 1B e Linf 2). Com a análise dos resultados do experimento preliminar, observou-se um melhor desempenho para o sistema Linf 1B, o qual foi escolhido para ser otimizado.

Para obter uma melhor especificidade, mantendo-se a boa sensibilidade, o primeiro passo para a obtenção de um sistema de detecção ótimo foi modificar as condições de ciclagem, seguidas por alterações na quantidade e concentração dos primers, desta forma foi definida a condição ótima de funcionamento do sistema de detecção escolhido. Os resultados com os experimentos de otimização, tais como a alta sensibilidade (detecção de até a 1 fg de DNA genômico), promoveram a análise em diluições mais baixas e aplicação do sistema Linf 1B em amostras de sangue.

Em relação à qualidade da amostra, a mesma pode ser verificada por meio de PCR para alvos constitutivos da célula, como por exemplo, genes da β -actina, β -globina, albumina e Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase (GAPDH) (GILSBACH et al., 2006; KOMPALIC-CRISTO et al., 2007; MARY et al. 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Em nosso estudo, a utilização da qPCR para GAPDH canino demonstrou a boa qualidade das amostras em teste.

Os ensaios iniciais para avaliação em amostras de sangue indicaram problemas na extração de DNA. As dificuldades encontradas na interpretação dos resultados positivos e negativos, levaram à necessidade de modificações no protocolo de extração. A hipótese de baixa recuperação de DNA foi o que motivou a escolha das alterações. Antes do término da etapa experimental deste estudo, evidenciou-se que o fabricante do *Kit* comercial escolhido (GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit) lançou uma nova apresentação do produto, com modificações em sua composição e execução. Alguns autores já relataram a relevância da extração para o sucesso da PCR, como por exemplo, Mary et al. (2004) que desenvolveram um método de quantificação do DNA de *L. infantum*, baseado na detecção do kDNA por meio de qPCR. Estes autores verificaram que a sensibilidade do sistema estava relacionada ao método de extração do DNA, a qual foi mais efetiva quando as células nucleadas foram isoladas antes da digestão com proteinase K sendo esta, executada *overnight*, quando comparada à extração direta do sangue total, com digestão por apenas 15 minutos.

A análise do limite de detecção do sistema demonstrou as diferenças em se trabalhar com DNA padrão (obtido de cultivo do parasito) e com uma amostra biológica mais complexa, como o sangue. Nos experimentos com DNA padrão de *L. infantum*, observou-se uma detecção até 0,1 fg. Quando amostras de sangue foram utilizadas, para não haver um resultado duvidoso, este limite passou a 10 fg. Esta observação também se estende aos gráficos de espectro e componente bem como,

curvas de amplificação e dissociação. Ao se utilizar DNA padrão, evidenciou-se curvas bem definidas, gráficos inconfundíveis. Quando amostras biológicas são utilizadas, todos os parâmetros oferecidos pelo *software* devem ser cuidadosamente avaliados, exigindo-se a capacidade interpretativa e uma boa análise comparativa com o NTC.

Analisando os ensaios de DNA padrão separadamente, observou-se uma oscilação do limite de detecção entre 1 fg e 10 fg, sendo reprodutível nos cinco experimentos. A curva-padrão manteve a linearidade em todos os ensaios, o que também foi observado nos experimentos de Nicolas et al. (2002), Mary et al. (2004) e Solano-Gallego et al. (2007). A detecção do número de cópias do DNA alvo (10 a 100 cópias) foi semelhante à apresentada por Schulz et al. (2003) (10 cópias), mostrando a boa eficiência da reação. Estes resultados confirmam a sensibilidade da técnica de qPCR e as vantagens na utilização do DNA do minicírculo para fins de diagnóstico uma vez que, este alvo está presente em torno de 10.000 cópias por kDNA (BARKER, 1989; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004). Trabalhos utilizando a mesma região alvo apresentaram sensibilidade e especificidade semelhantes, o mesmo ocorrendo com a curva-padrão, eficiência (ϵ) e coeficiente de correlação (R^2) (BRETAGNE et al., 2001; FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

Nicolas et al. (2002), desenvolvendo um sistema para detecção de *L. major* em tecidos de camundongos, também obtiveram a detecção de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Tal reconhecimento é esperado devido à alta homologia na região conservada dos minicírculos destas espécies, o que pôde ser confirmado no presente estudo.

A definição dos critérios de positividade foi importante para a análise das amostras de sangue. Casos com carga parasitária inferior ao limite de detecção foram claramente definidos como positivos associando-se os quatro parâmetros analisados (espectro, componente, curvas de amplificação e dissociação); por exemplo, o caso 11 apresentou carga parasitária mínima (4×10^{-4}), com amplificação precoce e dissociação com pico considerável, quando comparadas ao NTC, além da SYBR Green superando a ROX (referência passiva) nas análises de espectro e componente. O mesmo pode ser colocado para a análise dos controles; algumas destas amostras apresentaram quantificação, sendo necessária a avaliação por meio dos critérios de positividade para classificação em negativos.

Observou-se homogeneidade entre as duplicatas e, segundo Bretagne et al. (2001), Nicolas et al. (2002), Rolão et al. (2004) e Solano-Gallego et al. (2007) a técnica de PCR em tempo real é altamente precisa. Em relação à reprodutibilidade, não houve diferença estatística entre os ensaios, concordando com os autores acima mencionados.

Para avaliação do desempenho do sistema Linf 1B em amostras de sangue, o número de animais classificados como casos (21) foi semelhante ao publicado por Mary et al. (2004) em Marselha, França, avaliando a qPCR em 11 amostras de sangue e 10 de medula óssea de pacientes humanos com LV. Com relação aos controles, era esperado um “n” de 42 porém, devido a problemas de contaminação, o valor final foi de 12 animais, próximo ao utilizado por Solano-Gallego et al. (2007) em estudo para avaliar a detecção de DNA de *L. infantum* na urina de cães por meio da PCR em tempo real, utilizando 43 animais doentes e 10 saudáveis.

A sensibilidade de 100% apresentada pelo sistema Linf 1B em amostras de sangue, foi superior à registrada por Solano-Gallego et al. (2007) em urina de cães com LV (47%), possivelmente devido às diferentes amostras estudadas. Por outro lado, o sistema Linf 1B apresentou especificidade de 83,33%, inferior à encontrada pelo autor supracitado (100%) e superior à apresentada por Mary et al. (2004) (78,26%).

A análise comparativa com o sistema RV1/RV2 mostra que, utilizando-se amostras de sangue, o qPCR, utilizando os *primers* desenhados neste estudo, é mais sensível (sensibilidade PCR= 23,8%, qPCR= 100%). Em relação à especificidade, apesar da PCR convencional ter apresentado valor de 100%, as análises por meio dos IC e o teste χ^2 mostram que os dois testes (PCR convencional e qPCR) são equivalentes. Tais resultados diferem dos apresentados por Lachaud et al. (2002) que, comparando dois métodos de PCR convencional, com alvos diferentes (DNA genômico e kDNA), obtiveram melhores resultados para o sistema RV1/RV2 (kDNA) em amostras de sangue de cães, o qual apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Estes dados não se repetiram em nosso estudo possivelmente devido à ausência de reprodutibilidade dos *primers* RV1/RV2 quando aplicados em amostras de sangue, além da alta sensibilidade inerente a técnica de qPCR.

Os resultados de Lachaud et al. (2002) estimularam Gomes et al. (2007) a realizar estudo para verificar a habilidade do PCR (RV1/RV2) em diagnosticar a LVC

em diferentes amostras (biópsias de fígado, baço e linfonodo), no estado de São Paulo-Brasil. Os autores observaram que a maioria dos animais positivos em exame parasitológico (microscopia), foram positivos na PCR (29/31). Estes dados, possivelmente, relacionam-se com as amostras adotadas e com uma carga parasitária elevada uma vez que, os animais amostrados, apresentavam sintomatologia clássica da doença. A sensibilidade relatada por Lachaud et al. (2002), também foi determinada em amostras de sangue provenientes de cães com múltiplos sintomas de LVC.

Nunes et al. (2007) avaliando a PCR convencional para diagnóstico da LV em sangue de cães, em área endêmica (Poxoréo, MT) usando os *primers* 13A e 13B, descritos por Rodgers, Popper e Wirth (1990) para kDNA de *Leishmania* spp, obtiveram sensibilidade de 55%, especificidade de 66,3% e coeficiente de concordância Kappa de 0,2134. Tais resultados levaram os autores a concluir que a PCR não é uma boa ferramenta para triagem em populações de área endêmica. Manna et al. (2004) comparando a viabilidade de diferentes amostras teciduais para diagnóstico da LVC por PCR, sendo avaliadas 95 amostras de sangue de cães naturalmente infectados, provenientes do sul da Itália, obtiveram 85,3% de positividade pela IFI e 93,7% pela PCR convencional utilizando os *primers* 13A e 13B.

Apesar do uso dos mesmos *primers* (13A e 13B) e extração de DNA por métodos semelhantes, Nunes et al. (2007) e Manna et al. (2004) apresentaram resultados diferentes, o que fortalece a hipótese da baixa reprodutibilidade da PCR convencional para diagnóstico da LV em amostras de sangue de cães. Outro fato já mencionado e que deve ser considerado é, a possibilidade da eficiência da técnica está relacionada à carga parasitária, ou seja, animais com carga parasitária elevada seriam positivos pela técnica de PCR mas, em nosso estudo, esta possibilidade não foi confirmada; os cinco animais positivos pela PCR convencional (RV1/RV2) não foram os que apresentaram maior número de parasitas de acordo com a quantificação do qPCR.

Nos dados apresentados por Mary et al. (2004), a utilização da PCR em tempo real com *primers* derivados do sistema RV1/RV2 em sangue e medula óssea, mostraram a boa performance inerente a técnica, sendo possível relacionar a carga parasitária e o *status* clínico dos pacientes, concluindo-se que a quantificação parasitária é necessária para a correta interpretação dos resultados da PCR.

Desta forma, para verificar os avanços da PCR em tempo real para o diagnóstico da LVC, Francino et al. (2006) compararam a PCR convencional (sistema 13A/13B) e qPCR (adaptação do sistema 13A/13B) em amostras de medula óssea de cães, sendo 54% e 84% positivas pela PCR convencional e qPCR, respectivamente. As amostras negativas pelo PCR convencional apresentaram carga parasitária inferior a 30 parasitas/ml de medula óssea. Utilizando sangue periférico como amostra de 15 cães positivos para LVC, a sensibilidade do qPCR foi de 100%, concordando com nosso resultado. O sistema desenvolvido por Francino et al. (2006) permitiu elucidar os casos positivos pela PCR convencional, avaliar as diferentes respostas à terapia e validar a utilização de sangue como uma amostra menos invasiva para o diagnóstico da LV.

Segundo os estudos mencionados acima, observa-se que, além das vantagens operacionais, a PCR em tempo real é uma técnica reprodutível e sensível a qual, possivelmente, irá substituir a PCR convencional em rotinas de diagnóstico.

Apesar do nosso trabalho não focalizar a relação custo-benefício, analisando-se a adoção da qPCR nos Serviços de Referência para LV, as vantagens operacionais e dados obtidos pós-exame são satisfatórios, uma vez que, em Instituições que utilizam a PCR convencional como ferramenta diagnóstica, depois de implementada a tecnologia, os custos da PCR e qPCR tornam-se equivalentes, aproximadamente R\$ 6,18 (USD \$:3.85) por ensaio, semelhante ao descrito por Schulz et al. (2003) (USD \$:3.00), na Alemanha. No Brasil, Lira (2005) avaliando o desempenho dos *kits* EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos, bem como suas associações, para o diagnóstico da LVC verificou que, para obtenção de uma maior sensibilidade, os dois *kits* devem ser usados em associação, apresentando um custo de R\$ 4,65 (USD \$:2.89), próximo ao valor dos testes moleculares.

A possibilidade de implantação do PCR em tempo real no diagnóstico de alta complexidade em áreas endêmicas irá favorecer um retorno rápido e seguro aos pacientes. Assim, a utilização de uma técnica que seja capaz de diagnosticar com alta sensibilidade, monitorar a terapia e prevenir as recidivas, promove perspectivas mais amplas para o controle da doença.

5 CONCLUSÃO

A análise do alinhamento múltiplo das seqüências de minicírculos das várias espécies de *Leishmania* forneceu informações para o desenho dos *primers*, e estes foram aplicáveis para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico.

Os sistemas Linf 1A, Linf 1B e Linf 2 apresentaram características que permitiram a realização de processos de otimização para aplicação no diagnóstico da infecção por *L. infantum*, sendo o sistema Linf 1B o mais promissor.

As análises do experimento preliminar e experimentos de otimização mostraram que as condições padrões estabelecidas foram satisfatórias para o melhor desempenho do sistema Linf 1B.

O desempenho do sistema Linf 1B em amostra de sangue de cães, com sensibilidade de 100% e especificidade de 83,33% e, os resultados da análise comparativa com a PCR convencional (RV1/RV2), sugerem sua utilização nas rotinas dos Serviços de Referência para o diagnóstico da infecção por *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. C. et al. Single tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, p. 1210-1214, 2002.

ALEXANDRINO, A. C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre Pernambuco**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2001.

ALI, A.; ASHFORD, R. W. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence, and relation of infection to disease in an endemic area. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 88, p. 289-293, 1994.

APPLIED BIOSYSTEMS. **SDS Compendium 7000 SDS ver 2.1**. Atlanta, 2001. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com.au/sdscompendiums.htm>>. Acesso em: 11 maio 2005.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems. **Absolute Quantification Getting Started Guide**. Atlanta, 2005. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimeregide>>. Acesso em: 16 ago. 2006.

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

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 154, p. 1003-1011, 1986.

BAHK, Y. Y. et al. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 3299-3307, 2004.

BANETH, G. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, p. 14-15, 2008.

BARKER, D. C. The Ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electron microscopy images of isolated, purified networks. **Micron**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 21-62, 1980.

BARKER, D. C., Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 99, p. S125-146, 1989.

- BENGTSSON, M. H. et al. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 8, p. e45/1–e45/5, 2003.
- BESSETTI, J. An Introduction to PCR inhibitors. **Profiles in DNA**, March, 2007. p. 9-10. Disponível em:
<http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesInDNA_1001_09.pdf>. Acesso em: 10 Março 2008.
- BLACKELL, J. M.; MOHAMED, H. S.; IBRAHIM, M. E. Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, p. 268-74, 2004.
- BOEHME, C. C. et al. Congenital visceral leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 359-360, Feb. 2006.
- BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, Rio de Janeiro, ano 10, n. 61, p.4 - 5, Jan/Fev. 2003.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004. 120p.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave**. Normas e condutas. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. 51p.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância e Saúde. **Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2005**. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf> Acesso em: 20 nov. 2006.
- BRETAGNE, S. et al. Real Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 8, n. 4, p. 828-831, July 2001.
- BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 14, p. 437-438, 1998.
- BREWSTER, S.; BARKER, D. C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 96, p. 55-63, 2002.

- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- CARROLL, N. M.; ADAMSON, P.; OKHRAVI, N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 37, p. 3402-3404, 1999.
- CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 27, p. 549–553, 2003.
- CHAMBERLAIN, J. L. et al. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 11141-11156, 1988.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 873-882, Nov. 2007.
- COLER, R. N.; REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, p. 244-49, 2005.
- CORLESS, C. E. et al. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 38, p. 1747-1752, 2000.
- CORTES, S. et al. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 55, p. 277-283, Sept. 2006.
- COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, p. 223-228, 2001.
- COUTINHO, M. T. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1/2, p.149-155, Mar. 2005.

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

CUNHA, S. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 89, p. 155-158, 1995.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 07, p. 3126-3132, 2003.

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

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

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

DAVIES, C. R.; MAZLOUMI GAVGANI, A. S. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, p. 247-257, 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239-243, May/June 2001.

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

DILLON, R.J. et al. A functional genomics project for the investigation of sandfly-*Leishmania* interactions. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, v. 82, p. 39, 2005.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EI-SAYED, N. M. More surprises from *kinetoplastidae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 6, p. 2579-2581, 1999.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protzoa. **Science** / American Association for the Advancement of Science, Washington, v. 309, p. 404-09, 2005.

EVANS, T. G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 166, p. 1124-1132, 1992.

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

FERREIRA AW; ÁVILA SLM. **Diagnóstico imunológico das principais doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FICHOUX, Y. L. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in na área of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 37, n. 6, p.1953-1957, june 1999.

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

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, Feb. 2003.

GEHA, D. J. et al. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 32, p. 1768-1772 1994.

GILSBACH, R. et al. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real time PCR data. **BioTechniques**, Natick, v. 40, p. 173-177, Feb. 2006.

GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, p. 234-241, 2007.

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

GRIBBEN, J. G. et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. **Blood: the journal of hematology**, New York, v. 78, p. 3.275, 1991.

GRIMALDI, G., Jr.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, p. 230-250, July, 1993.

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

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 4, p. 413-417, Apr.1992.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 88, p. 7276-7280, Aug. 1991.

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**, New York, v. 113, p. 99-113, Jan. 2003.

INSTITUTO FLEURY. PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR). **Manual Fleury de Diagnóstico em Hematologia**. 2004. Disponível em: <www.institutofleury.org.br/educacao/manuais/manual_hemato/capitulo3b_impressao.htm>. Acesso em: 04 março 2007.

IVENS, A.C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. **Science / American Association for the Advancement of Science**, Washington, v. 309, p. 436-42, 2005.

KHALIL, E. A. et al. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 7, p.35-44, 2002.

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitology research**, Berlin, v. 101, n. 3, p. 619-25, 2007.

KILLICK-KENDRICK R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmania and their phlebotomine vectors. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, Paris, v. 78, p. 747-755, 1985.

KUBISTA, M. et al. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford NY, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

LACHOUD, L. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, London, v. 125, p.197-207, apr., 2002.

LAMBSON, B.; BARKER, D. C. Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p. S75–S80, 2002.

LAINSON, R.; BRAY, R. S. Transmission of *Leishmania mexicana* among laboratory hamsters in the absence of an insect vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 58, p. 287, 1964.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 137, p. 11-16, 2006.

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.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, New York, v.125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 142, p. 271-280, 2006.

MANNA, L. et al. Real time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal**, London, v. 177, p. 279-282, 2008.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, Oxford, v. 14, n. 4, p.319-321, Aug. 2004.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.42, n.11, p. 5249-5255, 2004.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, May 2000.

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**, São Paulo, v.44, n. 5, p. 255-259, Sept./Oct. 2002.

MORAL, L.; RUBIO, E. M.; MOYA, M. A leishmania skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, p. 129-132, 2002.

MORALES, M. A. et al. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 104-107, 2001.

MORENO, J. C. et al. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p. 328-332, 2000.

MORRISON, T. B. et al. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescence monitoring of PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 37, p. 987-992, 1999.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase-catalyzed reaction. **Methods in enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific american**, New York, v. 262, p. 56-65, 1990.

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

NICOLAS, L. et al. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.40, n.5, p. 1666-1669. 2002.

NICOLLE, C. J. 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisia'. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, n. 3, p. 1-26, 1908.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia**, Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2004.

NOYES, H. A. et al. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 36, p.2877-81, 1998.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, New York, v. 46, p. 39-51, 1998.

NTAMBI, J. M.; ENGLUND, P. T. A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 260, p. 5574-5579, 1985.

NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

NUWAYRI-SALTI, N.; KHANSA, H. F. Direct non-insect-vector transmission of *Leishmania* parasites in mice. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 15, n. 5, p. 497-500, Oct. 1985.

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**, Washington DC, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1997. **Manual de controle da leishmaniose visceral**. Disponível em : <<http://www.paho.org/Portuguese/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual-0.pdf>> Acesso em: 06 maio 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <www.who.int/.../leishmaniasis_maps/en/index.html>. Acesso em: 04 março 2008.

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

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**, Washington DC, v. 32, p. 746-749, 1994.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Basel, 2008. (In press).

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 141-146, Mar./Abr. 2004.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M. What does the future hold for clinical microbiology? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 151-159, 2004.

RAVEL, S. et al. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v. 59, p. 187-196, 1995.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, New York, v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.

RAY, D. S. Conserved sequence blocks in kinetoplastid minicircles from diverse species of Trypanosomes. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 9, n. 3, p. 1365-1367, 1989.

REA, S. et al. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. **Journal of dairy research**, London, v. 68, p. 689-698, 2001.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. 1. ed. Olinda: J. C. R., 2003.

REQUENA, J. M. et al. Recent advances in vaccines for leishmaniasis. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 4, p. 1505-17, 2004.

REY, L., **Parasitologia**. Rio de Janeiro: 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for new classification, **Annales de parasitologie humaine et comparee**, Paris, v. 65, p. 111-125, 1990.

RODRIGUEZ, N. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library useful for taxonomic purposes. **Experimental parasitology**, New York, v. 94, n. 3, p.143-149, 2000.

ROGERS, W. O.; WIRTH, D. F. Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 2, p. 565-569, 1987.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, p. 267-275, 1990.

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**, Lawrence, v.90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

ROSPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 970-972, Aug. 2005.

ROURA, X.; SANCHEZ, L.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, London, v.144, p. 262–264, 1999.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, C.S.O. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, Nov./Dez. 1997.

SCHAEFER, K. U. et al. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, p. 471–475. 1995.

SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 641-651, Aug. 2002.

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

SCHULZ, A. et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, Apr. 2003.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 511, July/Aug. 1984.

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

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 363–382, 1987.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 147, p. 315-319, 2007.

STURM, N.; SIMPSON, L. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region; **Nucleic acids research**, London, v. 19, p. 6277–6281, 1991.

SUNDSFJORD, A. et al. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Blegdamsvej, v. 112, p. 815-837, 2004.

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **The Lancet**, London, v. 1, p. 127-132, Jan. 1960.

THOMÉ, S.M.G. Cuidado com as leishmanioses. **Cães & Gatos**, Porto Feliz, v. 14, n. 85, p. 46-50, Set./Out. 1999.

TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.114, p.146-154, 2003.

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

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 89, n. 1, p. 95-100, 1995.

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**, London, v. 98, p. 148-151, 2004.

XIAO-SU, H.U. et al. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of leishmania donovani for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 04, p. 822–826, 2000.

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

ZIPPER, H. et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic acids research**, London, v. 32, n. 12, p. e103, 2004.

ZIJLSTRA E.E. et al. Endemic kala-azar in Eastern Sudan: A longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post kala-azar dermal leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, n. 6, p. 826-836, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Formulário de Pesquisa
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Desenvolvimento e avaliação de PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Eu, _____, RG _____, proprietário do cão _____ aceito que meu animal participe desse estudo, cujo objetivo é avaliar o desempenho do teste que utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR). Fui informado que o meu cão terá seu sangue coletado para os testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) no projeto acima referido. Fui orientado em relação aos benefícios desse estudo, que contribuirá para a busca de um diagnóstico mais seguro da leishmaniose visceral. Fui informado ainda que o material coletado será incorporado ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizado em pesquisas posteriores. Fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.

Contatos: Dr. Yara M Gomes, CPqAM/FIOCRUZ - Tel. 2101-2559
Milena P Cavalcanti, CPqAM/FIOCRUZ - Tel. 2101-2566

Recife, _____ de _____ de 2004.

Responsável pelo cão

Formulário de Pesquisa - CASOS
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Projeto: Desenvolvimento e avaliação de PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum*

Responsáveis: Milena de Paiva Cavalcanti e Yara de Miranda Gomes

1 - IDENTIFICAÇÃO

Nome do animal: _____ n^o _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

telefone: _____

2 - AVALIAÇÃO DO ANIMAL:

ESTADO NUTRICIONAL: ÓTIMO () BOM () REGULAR () PÉSSIMO ()

2.1 - SINTOMAS

alopecia () onicogrifose () inapetência () conjutivite () perda de peso ()
distensão abdominal () linfadenopatia ()

3 -COLHEITA DO MATERIAL:

sangue () raspado da lesão cutânea () raspado de pele íntegra () punção de medula ()

4 - OUTRAS INFORMAÇÕES IMPORTANTES

5 - DADOS SOBRE O VETOR:

Há queixa de mosquitos? (sim) (não)

Período de maior queixa. (manhã) (tarde) (noite)

Vegetação nas imediações – (primária) (secundária)

Já ouviu falar sobre a LVC? (sim) (não)

6 - RESULTADO DOS EXAMES:

ELISA: DO _____ CO _____

PARASITOLÓGICO: _____

qPCR: _____

APÊNDICE C

Formulário de Pesquisa - CONTROLES
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Projeto: Desenvolvimento e avaliação de PCR em tempo real para o diagnóstico da
infecção por *Leishmania infantum*

Responsáveis: Milena de Paiva Cavalcanti e Yara de Miranda Gomes

1 - IDENTIFICAÇÃO

Nome do animal: _____ nº _____

Idade: _____ sexo: _____ raça: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Telefone : _____

2 - AVALIAÇÃO DO ANIMAL:

Estado nutricional: ótimo () bom () regular () péssimo ()

Já tomou transfusão de sangue?

Já habitou em área endêmica para LVC?

3 -COLHEITA DO MATERIAL:

Sangue ()

4 - OUTRAS INFORMAÇÕES IMPORTANTES

5 - RESULTADO DOS EXAMES:

ELISA: DO _____ CO _____

IFI: _____

qPCR _____

ANEXOS

ANEXO A



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P.0241/05**, intitulado **“Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorologia para o diagnóstico da infecção por Leishmania chagasi em cães”** sob a responsabilidade da **Dra. Yara de Miranda Gomes - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Recife-PE**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)**. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 02 de março de 2010.

Rio de Janeiro, 02 de março de 2006.


Dr. Hugo Caire C. Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

Av. Brasil, nº 4365 – Mourisco – sala 07 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil
Tel: (+55) 21.3885-1698 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: hcastro@ioc.fiocruz.br/ceua@fiocruz.br



Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits

R.A. Lira^a, M. Paiva Cavalcanti^a, M. Nakazawa^a,
A.G.P. Ferreira^c, E.D. Silva^c, F.G.C. Abath^a, L.C. Alves^d,
W.V. Souza^b, Y.M. Gomes^{a,*}

^aDepartamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM,
Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ,

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

^bDepartamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM,
Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ,

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

^cDepartamento de Reativos para Diagnósticos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ,
Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^dDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos 52171-900, Recife-PE, Brazil

Received 8 August 2005; received in revised form 12 December 2005; accepted 18 December 2005

Abstract

This study evaluated the performance of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos (EIE-LVC) kit and to compare it with that of the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos (IFI-LVC) kit. Four groups of dogs were studied: group 1 (G1), dogs with clinical signs indicative of CVL and testing positive for the parasite ($n = 25$); group 2 (G2), dogs with only a presumed diagnosis of CVL ($n = 62$); group 3 (G3), dogs that had never lived in an area where CVL is endemic and never received a blood transfusion ($n = 16$); group 4 (G4), dogs carrying other parasites: such as babesiosis ($n = 4$), ehrlichiosis ($n = 6$) and demodicosis ($n = 1$). G1 and G3 were used for the calculation of sensitivity and specificity, respectively. The EIE-LVC showed a sensitivity of 72% (CI 95%: 50.4–87.1%) and a specificity of 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8%). The value of the kappa index was 0.975 (CI 95%: 0.926–1.024), which represents an excellent fit. For IFI-LVC, the sensitivity was 68.0% (CI 95%: 46.4–84.3%) and the specificity 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8%). When the tests were conducted in parallel, sensitivity was 92.0% (CI 95%: 72.5–98.6%) and specificity 75.0% (CI 95%: 47.4–91.7%). However, when conducted consecutively, the tests showed a sensitivity of 48.0% (CI 95%: 28.3–68.2%) and a specificity of 100.0% (CI 95%: 75.9–99.4%). The analysis of clinically suspected dogs using IFI-LVC and EIE-LVC kits in parallel, revealed that 26/62 animals were positive. Cross-reaction was

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012559; fax: +55 81 34532449.
E-mail address: yam@cpqam.fiocruz.br (Y.M. Gomes).

observed in a dog with demodicosis. These results lead to the following conclusions: (1) the performance of the EIE-LVC kit is not statistically different from the IFI-LVC and (2) the kits must be used in parallel if higher sensitivity is required, reducing the number of false-negative results.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Serodiagnosis; Canine visceral leishmaniosis; ELISA; Indirect immunofluorescence

1. Introduction

Visceral leishmaniosis (VL), also called kala-azar, is a zoonosis caused by protozoan parasites of the *Leishmania donovani* complex. *L. donovani* and *L. infantum* are the aetiological agents of visceral leishmaniosis in the Old World, and *L. chagasi* in the Americas (Palatinik-de-Souza et al., 2001; Ikonomopoulos et al., 2003). In Latin America, visceral leishmaniosis is caused by infection with *Leishmania chagasi*, which is usually transmitted by the bite of infected phlebotomine sand flies, *Lutzomyia longipalpis* (Miles et al., 1999). Domestic dogs (*Canis familiaris*) represent the main reservoir for *Leishmania* infection in human and other dogs. Thus, one of the most important approaches to controlling the incidence of human visceral leishmaniosis is to detect the infected dogs (Ashford et al., 1998).

Diagnosis of canine visceral leishmaniosis (CVL) is confirmed by detection of the parasite in stained smears of spleen, bone marrow, lymph node, or liver (Herwaldt, 1999). However, these diagnostic methods are invasive and not sensitive. In addition, they are not well suited for use in epidemiological surveys. Molecular methods that detect specific DNA of the parasite exhibit high sensitivity but their use is restricted to research laboratories. The current diagnostic methods used for *Leishmania* mass-screening surveys are the indirect immunofluorescence test (IIF), direct agglutination and enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) (Alves and Bevilacqua, 2004).

For canine surveys, the Brazilian Ministry of Health recommends the use of the IIF. According to Alves and Bevilacqua (2004), however, the use of IIF may decrease the effectiveness of the Kala-Azar Control Program by not detecting, and thus failing to sacrifice, false-negative infected animals. On the other hand, the program incorrectly identifies and leads to the unwarranted sacrifice of false positive

uninfected animals. In addition, the long delay between sample collection and sample analysis (30–80 days), and implementation of the control of infected dogs, means that dogs continue to infect sand fly vectors during this period and these, in turn, transmit VL to susceptible dogs and humans (Reithinger et al., 2002). As the elimination of infected dogs is an important means of controlling transmission of VL and given the difficulty of direct detection of the organisms, rapid, inexpensive and accurate indirect diagnosis of canine infection is an essential tool for VL surveillance programs (Scalone et al., 2002; Carvalho et al., 2002). Immunochromatographic dipstick tests for *Leishmania* diagnosis have recently been developed and are all based on recombinant K39 (rK39), a repetitive immunodominant epitope in a kinesin-related protein that is well preserved among viscerotropic *Leishmania* species (Burns et al., 1993; Reithinger et al., 2002). A commercially available dipstick test (*Leishmania* RPYDTEST; Intersep, Workingham, United Kingdom) has been shown to have 61–75% specificity and 72–77% sensitivity, indicating that its performance could be improved (Reithinger et al., 2002).

In the present study, we evaluated the performance of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-bio-manguinhos (EIE-LVC) kit and compared it with that of IFI-leishmaniose-visceral-canina-bio-manguinhos (IFI-LVC), both produced by Bio-Manguinhos/FIO-CRUZ, Brazil, so far as its use in epidemiological procedures is concerned.

2. Materials and methods

2.1. Dogs and samples

Serum samples were obtained from 114 domestic dogs of several breeds, between the ages of 3 months and 16-years old from the Small Animals Clinic

Veterinary Hospital, UFRPE (Federal Rural University of Pernambuco), situated in Recife, a city in the State of Pernambuco in the Northeast region of Brazil. An epidemiological questionnaire was filled in by the dog owners, and all animals were subjected to physical examinations. The study protocol was approved (P.0220/04) by the Animal Use Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Ministry of Health, Brazil). Written informed consent was obtained from all dog owners.

The dogs were divided into four groups: group 1 (G1), dogs with clinical signs indicative of CVL and testing positive for the parasite ($n = 25$); group 2 (G2), with suspected disease but without parasitological confirmation ($n = 62$); group 3 (G3), dogs that had never lived in an area where CVL is endemic and never received a blood transfusion ($n = 16$); group 4 (G4), dogs carrying other parasites ($n = 11$). Blood was collected and the serum stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used.

2.2. *Detección of amastigotes*

Bone marrow aspiration was performed on the iliac crest of the sternum, with the animal under sedation when necessary, by way of intravenous injection of 0.5 mg/kg of acepromazine. Smears were produced by placing the material collected on microscope slides stained with Panoptic, and these were examined for *Leishmania* amastigotes.

2.3. *Serology*

The IIF was performed using the IFI-leishmaniose-canina-Bio-Manguinhos (IFI-LC) kit, batch 04PL-C004Z, that uses as an antigen promastigote forms of *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF).

The ELISA was carried out using the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos (EIE-LVC) kit, batch 040EL009Z, that is based on soluble antigens of promastigote forms of *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF). The ELISA was carried out by two experienced technicians, who worked in a double blind scenario.

Both kits are produced by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, and all procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

2.4. *Statistical analysis*

Win Episcopo 2.0 software (De Blas et al., 2000) was used to calculate the values of sensitivity and specificity for the tests. The kappa index (k) was also evaluated using the same software to measure the concordance between the ELISA executed by the two technicians. The confidence interval (CI) was calculated to be 95%. For this work, presence of clinical signs and detection of parasites were used as gold standard for EIE-LVC validation. G1 and G3 were used for calculation of sensitivity and specificity, respectively.

3. Results

The parasitological tests revealed that, of the 87 dogs with only a presumed diagnosis of CVL, 25 were positive (G1) and 62 were negative (G2). G3 contained 16 dogs, and G4 included 11 dogs infected with other parasites, such as *Babesia canis* ($n = 4$), *Ehrlichia platys* ($n = 5$) and *Demodex canis* ($n = 1$).

Sensitivity and specificity were calculated on the basis of G1 and G3, respectively. The sensitivity of EIE-LVC (Table 1) was 72.0% (CI 95%: 50.4–87.1%) and the specificity was 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8%). The value of the kappa index was 0.975 (CI 95%: 0.926–1.024). When this group was analyzed using IFI-LVC, the sensitivity was 68.0% (CI 95%: 46.4–84.3%) and the specificity 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8%) (Table 1). Based on analysis of the CI, the serological EIE-LVC and IFI-LVC tests did not show significantly different sensitivities and specificities.

When the tests were conducted in parallel, sensitivity was 92.0% (CI 95%: 72.5–98.6%) and

Table 1
Diagnostic performance of the EIE-LVC and IFI-LVC test with serum from dogs with VL and uninfected dogs

Result	EIE-LVC		IFI-LVC	
	G1 ^a	G3 ^b	G1 ^a	G3 ^b
Positive	18	2	17	2
Negative	7	14	8	14
Sensitivity	72.0%	–	68.0%	–
Specificity	–	87.5%	–	87.5%

G1, dogs with VL; G3, uninfected dogs.

^a $n = 25$.

^b $n = 16$.

specificity 75.0% (CI 95%: 47.4–91.7%). However, when conducted consecutively, the tests showed a sensitivity of 48.0% (CI 95%: 28.3–68.2%) and a specificity of 100.0% (CI 95%: 75.9–99.4%). In addition, the analysis of G2 (dogs suspected of having CLV on the basis of clinical evidence), revealed that 26/62 animals were positive.

When the serum of animals carrying other parasites was tested using the IFI-LVC and EIE-LVC, cross-reaction by IFI-LVC was observed for one dog carrying *D. canis*.

4. Discussion

The serological conventional assays to diagnose CVL (IIF, DAT and ELISA) are used for individual diagnosis as well as in epidemiological studies. Although the IIF is the most widespread diagnostic method, cross reactivity with other diseases and low sensitivity in the detection of asymptomatic dogs are the main limitations of this technique. ELISA based on soluble antigens has proved to be as sensitive and specific as IIF and is suitable for epidemiological surveys (Evans et al., 1990; Mancianti et al., 1995). However, cross-reactivity with other canine parasites has also been reported for ELISA. To overcome this limitation, recombinant polypeptides containing specific *L. donovani/chagasi* epitopes that elicit an immune response in the majority of dogs and humans bearing visceral leishmaniasis, as A2, k39, k26, have been proposed to the diagnosis of CVL (Burns et al., 1993; Badaró et al., 1996; Braz et al., 2002; Carvalho et al., 2002; Scalone et al., 2002). Sensitivity and specificity of ELISA, using as k39 as antigen, in established *L. infantum* infection were 97.1 and 98.8%, respectively. In addition, use of a dipstick based on the recombinant k39 antigen has been described (Delgado et al., 2001).

Recently, an evaluation of ELISA using crude *L. chagasi* or *L. amazonensis* antigens, and recombinant antigens (rK39 and rK26) were compared using sera or eluates from dried blood collected on filter paper, to detect anti-*Leishmania* antibodies in dogs from a visceral leishmaniasis—endemic area in Brazil (Rosário et al., 2005). The results of this investigation showed that ELISA using crude and recombinant antigens produced similar sensitivities and speci-

cities. The sensitivities in sera using crude antigens of *L. amazonensis*, *L. chagasi* were 100 and 98%, respectively, whereas for the recombinant antigens rK39 and rK26, sensitivities 98.1 and 99.1%, respectively. The specificities using these antigens were extremely high. Thus, in contrast to previous studies (Burns et al., 1993; Badaró et al., 1996; Braz et al., 2002; Carvalho et al., 2002; Scalone et al., 2002), use of recombinant antigens in dogs identified having CVL did not improve results compared with use of crude antigen (Rosário et al., 2005).

The analysis of the EIE-LVC showed a sensitivity of 72.0% and a specificity of 87.5%. When the kappa index was analyzed, an excellent concordance was observed ($k = 0.975$), indicating reproducibility of the EIE-LVC. The sensitivity and specificity of the IFI-LVC were 68 and 87.5%, respectively.

In order to obtain higher values for sensitivity and specificity, the two kits were analyzed in combination (in parallel and consecutively). The use of a combination of the two tests, with different methods, minimizes the false-positive and false-negative results (Thrusfield, 1995). To obtain a positive result when the tests are carried out in parallel only one test needs to be reagent. When the tests are carried out consecutively, the result is considered positive only when both tests are reagent (Thrusfield, 1995).

In the present study, the use of the combination of EIE-LVC and IFI-LVC showed higher sensitivity (92%), when the analysis was conducted in parallel; and higher specificity (100%), when the analyses were conducted consecutively. As in epidemiological surveys it is necessary to employ a test (or combined tests) that present high sensitivity. In this regard, the use of the EIE-LVC and IFI-LVC in parallel would be more appropriate. However, the respective advantages and disadvantages of these kits should also be taken into consideration. If there are advantages in using the EIE-LVC in terms of automation and rapidity, there are disadvantages in using the IFI-LVC, because it needs to be interpreted by a well-trained technician. Moreover, in epidemiological surveys, the blood of the animals is collected in the field and taken to be processed in laboratories that possess the necessary structure. As a consequence, results are obtained only after a delay, making it difficult to eliminate infected dogs (i.e. those that tested positive for the serological test). Thus, in practice, public

health action that aims to identify and to eliminate the positive dogs is carried out in an ineffective manner. To minimize the problem of delay in obtaining results, the sera of the animals could be first analyzed using EIE-LVC and only the animals testing negative would be investigated with the IFI-LVC. In this way, the results could be released quickly, which would facilitate the elimination of the infected dog and prevent it from continuing to contribute to the transmission of the disease.

EIE-LVC and IFI-LVC in parallel were applied to a group of dogs suspected to have leishmaniasis on clinical grounds but without parasitological confirmation. Twenty-six out of 62 dogs tested positive, suggesting that the gold standard based on parasitological criteria was not sensitive enough.

A false-positive reaction was detected when serum from dogs carrying other parasitic diseases were tested, indicating cross-reaction. Taken together, the data suggest the following conclusions: (1) the performance of the EIE-LVC kit is not statistically different from the IFI-LVC and (2) the kits must be used in parallel if higher sensitivity is required, reducing the number of false-negative results.

Acknowledgments

This work was supported by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (grant no. C.C. 239/2005) and CNPq. Y.M. Gomes and F.G.C. Abath are recipients of CNPq research fellowships. R.A. Lira received a CPqAM/FIOCRUZ MSc scholarship for the duration of this study. M.P. Cavalcanti is receiving a PhD/CNPq scholarship.

References

- Alves, A.W., Bevilacqua, P.D., 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Bmsil, 1993–1997. *Cad. Saúde Pública* 20, 259–265.
- Ashford, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Shellock, I., Eulálio, M.C., Sampaio, D.P., Badaó, R., 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 53–57.
- Badaó, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E.M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Bums, J.M., Houghton, R.L., David, J.R., Reed, S.G., 1996. RK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173, 758–761.
- Bmz, R.F.S., Nascimento, E.T., Martins, D.R.A., Wilson, M.E., Pearson, R.D., Reed, S.G., Jeronimo, S.M.B., 2002. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 344–348.
- Bums Jr., J.M., Sheffer, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaó, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 775–779.
- Carvalho, F.A.A., Charest, H., Tavares, C.A.P., Matlashewski, G., Valente, E.P., Rabello, A., Gazzinelli, R.T., Fernandes, A.P., 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 289–295.
- De Blas, I., Ortega, C., Finkens, K., Noodhuizen, J., Thunfield, M., 2000. Programa de estatística: WIN EPISCOPE 2.0. Facultad de Veterinaria Zamora, Wageningen University, University of Edinburgh.
- Delgado, O., Feliciangeli, M.D., Coraspe, V., Silva, S., Perez, A., Arias, J., 2001. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8, 355–357.
- Evans, T.G., Vasconcelos, L.A.B., Lima, J.W., Teixeira, J.M., McAulliffe, I.T., Lopes, U.G., Pearson, R.D., Vasconcelos, A.W., 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 118–123.
- Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191–1199.
- Ikononopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavva, A., Stoitsiou, M., Gougoulis, V.G., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* 113, 99–113.
- Manciani, F., Falcone, M.L., Giannelli, C., Poli, A., 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 65, 1–9.
- Miles, M.A., Vexenat, J.A., Campos, J.H.P., Fonseca de Castro, J.A., 1999. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, Wiesbaden, Germany: Hoechst. Roussel. Vet., pp. 46–53.
- Palatinik-de-Souza, C., Santos, W.R., Fmça-Silva, J.C., Costa, R.T., Reis, A.B., Palatinik, M., Mayrink, W., Genaro, O., 2001. Impact of canine on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 510–517.
- Reithinger, R., Quinell, R.J., Alexander, B., Daves, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs:

- comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microb.* 40, 2352–2356.
- Rosário, E.Y., Genaro, O., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Marynk, W., Reis, A.B., Carneiro, M., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 197–203.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Balbi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignoni, W., Turtilli, C., Mondesire, Rr, Simpson, D., Donoghue, A., Frank, G., Gmndoni, L., 2002. Evaluation of *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 104, 275–285.
- Thrusfield, M.V., 1995. *Veterinary Epidemiology*, 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, England, p. 479.

ANEXO C

Available online at www.sciencedirect.com

The Veterinary Journal 175 (2008) 45–52

The
Veterinary Journalwww.elsevier.com/locate/tvj

Review

Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances

Y.M. Gomes ^{a,*}, M. Paiva Cavalcanti ^a, R.A. Lira ^a, F.G.C. Abath ^a, L.C. Alves ^b^a Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil

Accepted 25 October 2006

Abstract

Human visceral leishmaniasis (HVL) is endemic in the tropical and sub-tropical regions of Africa, Asia, the Mediterranean, Southern Europe and South and Central America, with approximately 500,000 new cases reported annually. As dogs are considered to be the major reservoirs for HVL, the accurate diagnosis of disease in these animals is important. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is performed mainly by direct parasitological methods that can yield false-negative results, either because of the very low number of *Leishmania* spp. organisms in clinical samples (bone marrow and lymph nodes) or because morphological identification is difficult. In addition, these methods are invasive. Conventional serological techniques are limited by cross-reactivity with other parasitic diseases and because several technical procedures have not been standardised. The development of polymerase chain reaction based approaches and immunoassays based on the use of recombinant antigens aimed at improving the sensitivity and specificity of CVL diagnosis is discussed.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Parasitological methods; Immunological methods; Molecular approaches

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is an endemic zoonotic disease caused by parasites of the *Leishmania donovani* complex: *L. d. donovani* and *L. d. infantum* in the Old World and *L. d. chagasi* in the New World (Palatinik-de-Souza et al., 2001; Ikonopoulou et al., 2003). *L. chagasi* was considered to be distinct from *L. infantum*, but recent molecular characterisation indicates that these organisms are indistinguishable (Mauricio et al., 2000).

Leishmania spp. parasites are transmitted by the bites of sand flies in the genera *Phlebotomus* (Old World) (Desjeux, 1996), and *Lutzomyia* (New World) (Grimaki and Tesh, 1993). Currently, *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia evansi* are considered to be vectors of VL in the Americas, however, *Lutzomyia forattini* has also been proposed as a

vector (Marcondes, 2001; Travi et al., 2002). In the Old World, several vectors are involved, among them *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. argentipes* and *P. orientalis* (El-naem and Osman, 1998; Desjeux, 1996; Kishore et al., 2006).

Several species of mammals have been found to be naturally infected with *Leishmania* spp. (Palatinik-de-Souza et al., 2001) but, in endemic areas, dogs are considered the major reservoirs for human visceral leishmaniasis (HVL) (WHO, 1995; Tafuri et al., 1996; Ciaramella et al., 1997). HVL is endemic in the tropical and sub-tropical regions of Africa, Asia, the Mediterranean, Southern Europe and South and Central America, with approximately 500,000 new cases reported annually. Over 90% of visceral leishmaniasis cases occur in India, Bangladesh, Brazil and Sudan (Desjeux, 1996).

In Brazil, the percentage of infected dogs living in an area where canine leishmaniasis is endemic ranges from 1% to 67% (Coutinho et al., 1985; Paranhos-Silva et al.,

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2101 2559; fax: +55 81 3453 2449.
E-mail address: yara@cpqam.fiocruz.br (Y.M. Gomes).

1996; Bernadina et al., 1997; França-Silva et al., 2003). However, the prevalence of infection in dogs is probably higher than figures reported from serological studies (Solano-Gallego et al., 2001).

The clinical signs of canine visceral leishmaniasis (CVL) appear progressively and cutaneous lesions may be present in combination with visceral disease (Lachaud et al., 2002). The clinical manifestations include non-pruritic skin lesions, such as exfoliative dermatitis and ulcerations, local or generalised lymphadenopathy, weight loss, anorexia, anaemia, conjunctivitis, ocular signs, diarrhoea, articular involvement, onychogryphosis, weakness and decreased activity, severe muscle atrophy and renal failure, which is often the main cause of death in infected dogs (Pumarola et al., 1991; Solano-Gallego et al., 2001). Clinical signs may be present from three months to several years after dogs become infected (Lanotte et al., 1979; Vidor et al., 1991), although some dogs may remain asymptomatic during the incubation period or never develop clinical signs. The main point here is that both symptomatic and asymptomatic animals are infective to sand fly vectors, allowing transmission of the parasite (Gradoni et al., 1987; Molina et al., 1994).

The differential diagnosis for CVL includes demodicosis, sarcoptic mange, flea dermatitis, cutaneous neoplasia, infectious and immune-mediated dermatitis, transmissible venereal tumour, ehrlichiosis, rickettsiosis and babesiosis (Reis et al., 2006; Barbosa de Deus et al., 2002).

The clinical diagnosis of CVL is relatively easy in dogs with symptomatic disease, for which a test with high specificity is sufficient. Diagnosis of CVL may be more difficult in asymptomatic dogs and in those animals with few clinical signs of disease (oligosymptomatic). In these cases and for epidemiological purposes, a test with high sensitivity is required. The value of each diagnostic test will vary depending on the reasons for attempting diagnosis, including confirmation of disease in dogs presenting with clinical signs, checking for infection in dogs having contact with clinical cases, epidemiological studies, screening dogs before entry to non-endemic countries or screening to remove infected dogs from the reservoir population. Different levels of sensitivity and specificity, cost and ease of testing will be needed for each purpose.

In order to provide more sensitive and accurate diagnostic tests, new tools based on parasitological, immunological and molecular approaches have been developed and validated. The goal of the present overview is to demonstrate the state of art of parasitological, immunological, and molecular methods to detect *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) in dogs.

2. Parasitological methods

Classically, the diagnosis of CVL is confirmed by direct demonstration of the parasite. Intracellular *Leishmania* spp. can be identified in different sample preparations, such as stained smears of skin lesions, spleen, liver, bone marrow and lymph node aspirates. Examination of Wright's,

Giemsa or Leishman's stained slides of these tissues is still the technique most commonly used to detect the parasite (Herwaldt, 1999). The samples are examined for amastigotes by light microscopy under oil immersion. Direct examination of bone marrow aspirates and microscopic examination of lymph node smears can yield false negative results, either because of the very low number of parasites (no parasites in 1000 microscopic fields to 100 parasites per microscopic field) in bone marrow and lymph nodes, especially in asymptomatic dogs (Chulay and Bryceson, 1983), or because of haemodiluted samples (Piarroux et al., 1994; Ikononopoulos et al., 2003).

Other conventional methods for parasitological diagnosis include in vitro culture of fragments or tissue aspirates in biphasic medium (Palma and Gutierrez, 1991) or inoculation into laboratory animals, mainly hamsters (Herwaldt, 1999). Histopathological analysis of infected organs, such as spleen, liver, lymph nodes and bone marrow, is also used to detect intracellular parasites (Keenan et al., 1984; Tafuri et al., 2001). However, these diagnostic methods are limited by low sensitivity and results are frequently inconclusive. In addition, they require repeated tissue sampling and trained laboratory staff (Badaró et al., 1986).

Several research groups have attempted to improve the parasitological methods, aiming to increase their sensitivity. Barreca et al. (2000) demonstrated a higher number of promastigotes in Novy-Mac-Neal-Nicole (NNN) cultures inoculated with canine bone marrow, when culture samples were stained with acridine orange vital stain, compared with those detected by Giemsa staining. According to these authors, staining with acridine orange is a useful technique for estimation of the number of viable parasites present in a culture and additionally enhances the visualisation of the parasites.

Recently, a comparison between splenic and lymph node aspirates for the parasitological detection of *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) infection in dogs was performed by Barrouin-Melo et al. (2004), suggesting the use of spleen instead of lymph node aspiration as the method of choice for parasitological diagnosis.

Immunohistochemical methods can be used as a supplementary tool to confirm the diagnosis based on haematoxylin and eosin stained sections, particularly in organs that do not have a high parasite load (Hofman et al., 2003). However, these methods are invasive, time-consuming and inappropriate for epidemiological surveys.

Quantitative Buffy Coat (QBC) was also proposed to detect amastigotes in the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of humans and dogs infected with *L. chagasi* (Liarte et al., 2001). The results demonstrated a QBC sensitivity of 97%, and the test was able to detect two infected but asymptomatic dogs. However, the authors emphasised that experiments on uninfected dogs from endemic and non-endemic areas should be performed to evaluate the specificity of QBC.

In countries where the elimination of infected dogs is an important method for controlling transmission of VL, for

example in Brazil, given the difficulty of direct detection of the organisms, rapid, inexpensive and accurate indirect diagnosis of canine infection represents an essential tool in VL surveillance programmes (Carvalho et al., 2002; Scalone et al., 2002). Efforts to avoid invasive methods of diagnosis have focussed on serological and molecular approaches, which are discussed below.

3. Serological methods

3.1. Serological conventional methods

CVL is usually diagnosed by detecting IgG that binds specifically to *Leishmania* spp. antigens. Several serological tests are used, such as indirect fluorescent antibody test (IFAT), direct agglutination test (DAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These serological conventional assays are used for individual diagnosis, but may also be used for field surveys.

Despite these serological advances, problems with the occurrence of false positive results have been reported. These results may appear due to cross-reactivity in dogs with cutaneous leishmaniasis, Chagas' disease, ehrlichiosis, rickettsiosis and toxoplasmosis (El Amin et al., 1986; Harith et al., 1987; Costa et al., 1991; Barbosa de Deus et al., 2002). Conversely, the use of crude or partially purified antigens of promastigotes, as well as different procedures in different laboratories, leads to inconsistent results. These difficulties illustrate a need for a better understanding and standardisation of procedures and molecular reagents. In addition, adequate levels of sensitivity and specificity are particularly desirable to avoid false negative and false positive reactions that can lead respectively to disease transmission and unnecessary euthanasia of healthy dogs.

Facing the above problems, several research groups have evaluated the use of monoclonal antibodies (Mabs) for the diagnosis of VL. A competitive ELISA, using three Mabs produced against *L. donovani* (D2, D13 and D14), showed a sensitivity and specificity of 90% and 100%, respectively, for patients with VL (Jaffe and McMahon-Pratt, 1987). Dogs were not included in that study.

Although Mabs are directed against specific epitopes, cross-reactions may occur due to shared epitopes (Bergquist, 1992). In addition, the production of Mabs exclusively reacting with one antigen is presently more difficult than generating specific antigens by recombinant DNA techniques. This is because the selected epitope is exactly specified by its DNA sequence, whereas antibody reagents have to be chosen from an array of Mabs with different and, in principle, unknown specificities. Although the increasing number of Mabs available against several parasites, including *Leishmania* spp. (Jaffe and McMahon-Pratt, 1987; Evans, 1988; Hu et al., 1988; Sinha et al., 1992), is overcoming this hurdle, the lack of field-applicable techniques continues to limit the routine use of serology in national programmes.

Attempts have been made to replace conventional crude antigens by purified native parasite proteins (Santos et al., 1987; White and McMahon-Pratt, 1988; Kaul et al., 2000). However, such proteins are present in very limited quantities and their purification by biochemical techniques is laborious. One way to overcome this problem is the use of genetic engineering, which permits greater quantities of defined antigens to be obtained.

Western blot analysis of whole-parasite antigens is considered to be sensitive when low serum antibody titres are present (Riera et al., 2004) and has been proven to be highly specific for the diagnosis of CVL (Carrera et al., 1996). Recently, a quantitative computerised Western blot test was evaluated during experimental canine *L. infantum* infection, with the aim of improving the diagnosis and prognosis of CVL (Talmi-Frank et al., 2006). Antibodies from infected dogs distinguished between immunodominant bands (12, 14, 24, 29, 48 and 68 kDa) that showed significantly increased intensities and higher frequencies than the non-immunodominant bands at all time points. Reactivity with the 14, 48 and 68 kDa bands signified early infection, whereas increased reactivity with 14, 24, and 29 kDa bands was associated with post-treatment parasite persistence and an unfavourable prognosis (Talmi-Frank et al., 2006). According to these authors, these immunodominant antigens will be valuable for early detection and treatment evaluation of CVL.

3.2. Serological non-conventional methods

The problems with the conventional assays (IFAT, DAT and ELISA), discussed in the previous section, may be overcome by using recombinant polypeptides containing a specific *L. donovani*/*L. chagasi* epitope that elicits an immune response in the majority of dogs and humans with visceral leishmaniasis.

Recombinant DNA technology has led to the molecular cloning of several genes encoding antigenic *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) proteins. Cloned segments of *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) genes have been used to produce portions of antigenic proteins in bacteria and several of these, singly or in combination, have been used as target antigens in serodiagnostic assays.

Recombinant *Leishmania* spp. Hsp90 and Hsp70 were recognised by sera from visceral leishmaniasis but not Chagas' disease patients, despite the fact that *Trypanosoma cruzi* Hsp90 and Hsp70 share >80% amino acid identity with their counterparts in *Leishmania* spp. (Andrade et al., 1992). A test based on ELISA for the serodiagnosis of CVL, using as antigen the recombinant *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) Hsp70 (Rec. ELISA), was developed by Andrade et al. (1998). The Rec. ELISA was compared with the conventional ELISA (Conv. ELISA) to analyse sera of dogs from endemic areas in northeast Brazil. This work revealed that 75% (320/421) of sera agreed in the ELISAs, 2.8% being positive and 73.2% being negative in the Rec. ELISA and Conv. ELISA, respectively. On the basis of

these results Rec. ELISA may be useful for diagnosis of CVL and requires further investigation.

Carvalho et al. (2002) have investigated the recombinant *L. donovani* A2 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs. A2 is expressed in amastigotes as a family of proteins that display a variable number of repeats of a unit of 10 amino acids (Zhang et al., 1996). In endemic areas in Brazil, the anti-A2 antibodies were detected by ELISA in 77% of sera from patients with symptomatic VL and in 87% of sera from dogs that tested positive in IFAT or by parasitological evaluation. In addition, anti-A2 antibodies were also detected in 14/15 symptomatic and in 10/13 asymptomatic dogs. Among the asymptomatic/anti-A2 positive animals, nine were also positive for the presence of parasites, and no significant cross-reaction was observed with sera of animals with other common diseases. These findings showed that A2 antigen is potentially useful for the diagnosis of VL in the New World, and will be particularly useful for the diagnosis of CVL (Carvalho et al., 2002).

The cloning of a *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) antigen gene and an evaluation of antibody responses in leishmaniasis patients to the recombinant protein rK39 was reported by Burns et al. (1993). The sequence encoded an immunodominant protein with a repetitive epitope closely conserved between *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) and *L. donovani*. This repeat is part of a kinesin-related protein expressed predominantly by amastigotes. Serological evaluation by ELISA revealed that 98% (56/57) of Brazilian and 100% (50/50) of Sudanese visceral leishmaniasis patients (VLP) had detectable serum antibody responses to the K39 repeat. In addition, detectable anti-K39 antibody was absent in cutaneous and mucosal leishmaniasis patients and in individuals infected with *T. cruzi* (Burns et al., 1993). These findings were confirmed by Badaró et al. (1996) in a study that analysed the sensitivity and specificity of rK39 in comparison with crude promastigotes of *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) by using sera from VLP (acute, asymptomatic, subclinical VL), as well as from dogs with VL. According to these authors, reactivity to rK39 is a serologic indicator of disease caused by *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) infection. Reactivity to this antigen accompanies acute disease and also exists in subclinical cases that progress to VL, preceding disease signs or symptoms (Badaró et al., 1996; Braz et al., 2002).

These results stimulated a study to evaluate the rK39 antigen as a diagnostic marker for CVL and to validate a standardised ELISA with a large number of canine sera through a multi-centre study in five Italian regions endemic for human and canine leishmaniasis caused by *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Scalone et al., 2002). The IFAT was used as reference serological test. Standardised ELISA and IFAT results were highly concordant. The timing and pattern of ELISA and IFAT seroconversion in dogs followed prospectively after natural infections were very similar. In addition, antibodies reacting with rK39 were more common in asymptomatic canine infections than reported for

subclinical human VL. Thus, the rK39 ELISA is a relatively simple and rapid assay for assessing the infection status of dogs and is an alternative to IFAT, especially when the objective is to screen large numbers of samples (Scalone et al., 2002).

These studies were extended to the application of rK39 in an immunochromatographic dipstick format for diagnosis of CVL, with a sensitivity and specificity of 70.9% and 84.9%, respectively (Mohebbi et al., 2004). This dipstick based on rK39 was also used to test HVL showing a sensitivity of 87.8% and a specificity of 100% (Delgado et al., 2001). As the dipstick rK39 test is rapid, non-invasive and does not require much expertise or elaborate equipment, it can be used for rapid screening and diagnosis of CVL and HVL (Delgado et al., 2001; Mohebbi et al., 2004).

In addition to K39, three recombinant antigens of *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (K9, K26 and K39 sub) were expressed in prokaryotic systems and evaluated as diagnostic markers of infection by employing a multiple-well ELISA (Rosati et al., 2003). The sensitivity and specificity of ELISAs using K26 as antigen (evaluated with sera from 20 parasitologically positive and 20 parasitologically negative dogs) were both 100% (95% CI = 92.2–100). When K9 and K39sub were used together, the sensitivity was 95% (95% CI = 75.1–99.9) and the specificity was 100% (95% CI = 83.2–100). According to Rosati et al. (2003) these results indicate that each antigen carries immunodominant epitopes and that the combination may further increase the sensitivity of currently available serological test.

In this context, two recombinant antigens of *T. cruzi*, cytoplasmic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA), displayed better results when used in combination than separately (Krieger et al., 1992). The sensitivity and specificity were 98.2–100% and 100%, respectively, and no cross-reactivity was observed with other parasitic diseases, such as leishmaniasis (Gomes et al., 2001; Gadelha et al., 2003). Since the sensitivity of serological tests is usually higher in multiple epitope formats, the genes encoding the relevant epitopes of K9, K26 and K39 were joined to produce a chimeric recombinant protein (Boarino et al., 2005). This antigen was evaluated by ELISA using a panel of human and dog sera characterised by parasitological and/or serological techniques. The chimeric ELISA showed 99% specificity in both human ($n = 180$) and canine ($n = 343$) control groups, while sensitivity was higher in canine VL (96%, $n = 213$) than human VL (82%, $n = 185$). In addition, concordance between IFAT and canine chimeric ELISA ($k = 0.95$) was higher than between IFAT and human chimeric ELISA ($k = 0.81$). These results support the potential use of this new antigen for routine serodiagnosis in both human and canine hosts (Boarino et al., 2005).

Recently, ELISAs using crude *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) or *L. amazonensis* and recombinant antigens (rK-39 and rK-26) were compared using sera or eluates from dried blood collected on filter paper to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area in

Brazil (Rosário et al., 2005). The results showed that ELISA using crude and recombinant antigens gave the same degree of sensitivity and specificity in identifying different clinical phases of CVL. In addition, high concordance among sera and eluates confirmed that filter paper could be used to collect blood in canine surveys to identify *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) infection.

On the other hand, use of the recombinant antigens did not markedly improve results compared with use of crude antigen in infected dogs (Rosário et al., 2005). However, the main limitation of crude antigens is the cross-reactivity with other endemic diseases that occur in VL areas.

4. Molecular methods

Polymerase chain reaction (PCR) technology is being used for the diagnosis of several parasitic diseases, including leishmaniasis. Diagnosis by PCR is based on the in vitro amplification of specific-nucleotide sequences present in the parasite. In order to understand the use of PCR for the detection of *Leishmania* spp., the genomic complexity of this parasite will be briefly discussed.

Leishmania spp. cells, like other kinetoplastids, contain a complex network of concatenated circular DNA molecules (termed kinetoplast DNA or kDNA) within their single mitochondrion. The mitochondrial DNA of this parasite represents about 20% of the total cellular DNA and is organised in a disk-shaped network where thousands of small interlocked minicircles make up 95% of this structure. Each *Leishmania* spp. minicircle has a 120–200 base pair (bp) conserved region, present in every molecule, and a variable region (Simpson, 1987; Degraeve et al., 1994). The conserved region contains three highly conserved blocks and some less conserved regions that can be used as PCR targets for the discrimination of groups of *Leishmania* spp. In addition, other targets have been used for PCR, such as ribosomal DNA and the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) of this gene (Nasereddin et al., 2006), although these tests are expected to be less sensitive because of lower copy number of the target.

PCR is a sensitive and specific method for the detection of *Leishmania* spp. DNA in a variety of clinical samples from humans (Piarroux et al., 1994), dogs (Degraeve et al., 1994; Lachaud et al., 2002; Strauss-Ayali et al., 2004) and foxes (Silva et al., 2000). In addition, this approach have been shown to be more sensitive than serology or culture assay in the diagnosis of CVL in South America and Europe, suggesting that this methodology might become the gold standard for detecting *Leishmania* spp. infection. The unique characteristics of kinetoplast minicircle DNA in *Leishmania* spp. has allowed the selection of complex, species, subspecies, strain and even isolate-specific DNA probes. In the wider context of human disease, DNA diagnosis has advanced rapidly in the last few years (Guerin et al., 2002).

Quantitative real-time PCR allows the continuous monitoring of the accumulation of PCR products during the

amplification reaction. This allows the identification of the cycle of near logarithmic PCR product generation (threshold cycle) and, by inference, the precise quantification of the template DNA present at the start of the reaction. From the quantification of the template DNA, an estimation of the relative load of parasites in different samples can be obtained. The advantages compared to standard PCR techniques are a reduction in assay time, reduced risk of contamination and improved sensitivity (Mortarino et al., 2004).

In recent years, quantitative PCR methods based either on SYBR Green or TaqMan chemistries and related technologies have been established for the quantification of *Leishmania* spp. in mouse liver, mouse skin and human peripheral blood, targeting either single-copy chromosomal or multi-copy minicircle sequences, with high sensitivity and reproducibility (Mortarino et al., 2004). According to Vitale et al. (2004) the quantitative PCR is useful for the diagnosis of leishmaniasis in dogs and humans, and it facilitates the monitoring of parasite levels during pharmacological treatment.

Qualitative PCR assay is useful when it is necessary to have an immediate and sensitive diagnosis, especially in cases with dubious serological results (Vitale et al., 2004). A novel method that incorporates a real-time PCR assay allows the quantification of nucleic acid template by analysing the kinetics of PCR during amplification cycles (Bretagne et al., 2001). A highly accurate, reproducible, and sensitive real-time PCR using TaqMan technology was developed by Vitale et al. (2004). In a procedure that used a specific pair of primers, a 117 bp fragment was amplified from minicircle kDNA. The assay was able to detect even a single parasite (200 fg of genomic DNA). These authors applied a rapid extraction method coupled with the real-time PCR. This approach was not only as sensitive as a conventional PCR assay for detection of *Leishmania* spp. kDNA but also potentially useful for the quantification of parasite burdens in humans and dogs.

Real-time PCR also can be used for detection and diagnosis of microorganisms belonging to the same genus. This allows not only an accurate detection and quantification of specific DNA in various biological samples, but also allows species or strains of several medically important pathogenic microorganisms to be differentiated by melting curve analysis of fluorescent PCR products (Logan et al., 2001). In this context, *L. major* was differentiated from *L. donovani* and from *L. tropica* and *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), according to the melting temperature, which is a function of GC/AT ratio, length and nucleotide sequences of the amplified product. Melting curve analysis offers a rapid alternative for identification of species in diagnostic or epidemiological studies of leishmaniasis or asymptomatic parasitism (Nicolas et al., 2002). Quantitative real-time PCR can be used to monitor response to treatment, particularly in clinical samples with very low number of parasites (Meide et al., 2005).

5. Conclusion

The technological advances made in recombinant antigens as reagents for the serological diagnosis of VL and the identification of parasites in blood samples by PCR techniques have resulted in greater accuracy in the diagnosis of CVL. Both recombinant antigens and PCR need to be more widely available to have an impact on disease control. Thus, reducing the costs of these techniques remains a major challenge if it is intended to use these tools in endemic areas in developing countries.

References

- Andrade, C.R., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., Keiko, O., Otsu, K., 1992. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 330–335.
- Andrade, P.P., Santos, E.S.C., Kido, E.A., Queiroz, I.M., Luna, L.K.S., Torquato, G.N., Baltino, V.Q., 1998. Assessment of a recombinant *Leishmania* Hsp70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II), 217.
- Badaró, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C., 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific response. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, 72–78.
- Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E.M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, R.L., David, J.R., Reed, S.G., 1996. RK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173, 758–761.
- Barbosa de Deus, R., Mares Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 1356–1361.
- Barreca, G.S., Matera, G., De Majo, M., Lambertini, A., Liberto, M.C., Foca, A., 2000. Early detection of *Leishmania* promastigotes in dog bone marrow cultures by acridine orange stain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37, 247–251.
- Barrouin-Melo, S.M., Laranjeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H.P., Conrado-dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 195–197.
- Bergquist, N.R., 1992. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. IV), 29–38.
- Bernadina, W.E., De Luna, R., Oliva, G., Ciaramella, P., 1997. An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *L. infantum*. *Veterinary Parasitology* 73, 207–213.
- Boarino, A., Scalone, A., Griadoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M.G., Rosati, S., 2005. Development of recombinant chimeric antigens expressing immunodominant B epitopes of *L. infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12, 647–653.
- Braz, R.F.S., Nascimento, E.T., Martins, D.R.A., Wilson, M.E., Pearson, R.D., Reed, S.G., Jeronimo, S.M.B., 2002. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 344–348.
- Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J.F., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M., 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 828–831.
- Burns Jr., J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaró, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detect specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 775–779.
- Carvalho, F.A.A., Charest, H., Tavares, C.A.P., Matlashewski, G., Valente, E.P., Rabello, A., Gazzinelli, R.T., Fernandes, A.P., 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 43, 289–295.
- Carrera, L., Fermin, M.L., Tesouro, M., Garcia, P., Rollan, E., Gonzalez, J.L., Mendez, S., Cuquerella, M., Ahunda, J.M., 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Experimental Parasitology* 82, 139–146.
- Chulay, J.D., Bryceson, A.D., 1983. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 475–479.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R.D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechini, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 22, 539–543.
- Costa, C.A., Genaro, O., Lana, M., Magalhães, P.A., Dias, M., Michalick, M.S., Melo, M.N., Costa, R.T., Magalhães-Rocha, N.M., Mayrink, W., 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24, 21–25.
- Coutinho, S.G., Nunes, M.P., Marzochi, M.C.A., Tramontano, N., 1985. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80, 17–22.
- Degrave, W., Fernandes, O., Thieme, O., Wincker, P., Brito, C., Cardoso, A., Borges Periera, J., Bozza, M., Lopes, U., Morel, C., 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 367–368.
- Delgado, O., Felicianelli, M.D., Coraspe, V., Silva, S., Perez, A., Arias, J., 2001. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8, 355–357.
- Desjeux, P.H., 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology* 14, 417–423.
- El Amin, E.R., Wright, E.P., Abdel Rahman, A.M., Kolk, A., Laarman, J.J., Pondman, K.W., 1986. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80, 271–274.
- Elhajem, D.A., Osman, F.O., 1998. Evidence for active transmission of visceral leishmaniasis within a village in eastern Sudan. *Acta Tropica* 71, 305–309.
- Evans, T., 1988. Development of monoclonal antibodies to assay for circulating antigen in visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 471–474.
- França-Silva, J.C., Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L.L., Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O., Nascimento, E., 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 111, 161–173.
- Gadelha, A.A.M., Verçosa, A.F.A., Lorena, V.M.B., Nakazawa, M., Carvalho, A.B., Souza, W.V., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Gomes, Y.M., 2003. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. *Vox Sanguinis* 85, 165–170.
- Gomes, Y.M., Pereira, V.R.A., Nakazawa, M., Rosa, D.S., Barros, M.N.D.S., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Ogatta, S.F., Krieger, M.A., Goldenberg, S., 2001. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by

- using E1E-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96, 497–501.
- Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M., Mancianti, F., 1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. Medical and Veterinary Entomology 1, 339–342.
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Reviews 6, 230–250.
- Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, P., Wasunna, M.K., Bryceson, A.D.M., 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infectious Diseases 2, 494–501.
- Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A., Leeuwenburg, J., Faber, F.J., Muigai, R., Kiugu, S., Laarman, J.J., 1987. Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81, 603–606.
- Herwaldt, B., 1999. Leishmaniasis. Lancet 354, 1191–1199.
- Hofman, V., Brousset, P., Mougneau, E., Marty, P., Lamant, L., Antoine, J.C., Glaichenhaus, N., Hofman, P., 2003. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (10–11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. American Journal of Clinical Pathology 120, 567–574.
- Hu, X.S., Liu, Q., Lin, F.Q., Yi, T.L., Wang, Y.J., Qin, Z., Luo, P., Wang, L., 1988. Kala-azar infected serum circulating antigens and their characteristics detected by monoclonal antibody. American Journal of Chinese Medicine 101, 1–6.
- Ikononopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary Parasitology 113, 99–113.
- Jaffe, C.L., McMahon-Pratt, D., 1987. Serodiagnostic assay for visceral leishmaniasis employing monoclonal antibodies. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81, 587–594.
- Kaul, P., Malla, N., Kaur, S., Mahajan, R.C., Ganguly, N.K., 2000. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 94, 173–175.
- Keenan, C.M., Hendricks, L.D., Lightner, L., Johnson, A.J., 1984. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. Veterinary Pathology 21, 80–86.
- Kishore, K., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D.S., Kumar, A.J., Das, P., Bhattacharya, S.K., 2006. Vector control in leishmaniasis. The Indian Journal of Medical Research 123, 467–472.
- Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Lafaille, J.J., Pereira, J.B., Krieger, H., Carvalho, M.R., Goldenberg, S., 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 46, 427–434.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessy, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology 125, 197–207.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Perieres, J., Vollhardt, Y., 1979. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 54, 277–295.
- Liarte, D.B., Mendonça, I.L., Luz, F.C.O., Abreu, E.A.S., Mello, G.W.S., Farias, T.J.C., Ferreira, A.F.B., Millington, M.A., Costa, C.H.N., 2001. QBC® for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: preliminary data. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 34, 577–581.
- Logan, J.M.J., Edwards, K.J., Saunders, N.A., Stanley, J., 2001. Rapid identification of *Gamphylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology 39, 2227–2232.
- Marcondes, C.B., 2001. Entomologia Médica e Veterinária, Atheneu, Sao Paulo, 432pp.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology Today 16, 188–189.
- Meide, W.F.V.D., Schoone, G.J., Faber, W.R., Zeegelaar, J.E., Vries, H.J.C., Özbel, Y., A Fat, R.F.M.L., Coelho, L.I.A.R.C., Kassi, M., Schallig, H.D.F.H., 2005. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. Journal of Clinical Microbiology 43, 5560–5566.
- Mohebbi, M., Taran, M., Zarei, Z., 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. Veterinary Parasitology 121, 239–245.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., Gonzalez, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 88, 491–493.
- Mortarino, M., Franceschi, A., Manciant, F., Bazzocchi, C., Genchi, C., Bandi, C., 2004. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. Parasitologia 46, 163–167.
- Nasereddin, A., Eregat, S., Azmi, K., Baneth, G., Jaffe, C.L., Abdeen, Z., 2006. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. Journal of Parasitology 92, 178–183.
- Nicolas, L., Milon, G., Prina, E., 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by Light Cycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. Journal of Microbiological Methods 51, 295–299.
- Palatinik-de-Souza, C.B., dos Santos, W.R., França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatinik, M., Mayrink, W., Genaro, O., 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 65, 510–517.
- Palma, G., Gutierrez, Y., 1991. Laboratory diagnosis of *Leishmania*. Clinics in Laboratory Medicine 11, 909–922.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A., Santos, W.C., Grimaldi, G.J., Pontes-de-Carvalho, L.C., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55, 39–44.
- Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B., Quilici, M., 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. Journal of Clinical Microbiology 32, 746–749.
- Pumarola, M., Brevik, L., Badiola, J., Vargas, A., Domingo, M., Ferrer, L., 1991. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. Journal of Comparative Pathology 105, 279–286.
- Reis, A., Martins-Filho, O., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M., Mayrink, W., França-Silva, J., Giunchetti, R., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Research in Veterinary Science 81, 68–75.
- Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gallego, M., Portus, M., 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98, 102–110.
- Rosário, E.Y., Genaro, O., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Marynk, W., Reis, A.B., Carneiro, M., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a

- diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 197–203.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Bollo, E., Gradoni, L., 2003. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10, 1153–1156.
- Santos, J.L., Morgado, M.G., Galvão Castro, B., 1987. Human visceral leishmaniasis: analysis of the specificity of humoral immune response to polypeptides of *Leishmania donovani chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37, 263–270.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R.R., Simpson, D., Donoghue, A.R., Frank, G.R., Gradoni, L., 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 104, 275–285.
- Silva, E.S., Pírmex, C., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Brazil, R.P., 2000. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 147, 421–422.
- Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology* 41, 363–382.
- Sinha, R., Arora, S.K., Datta, U., Sehgal, S., 1992. Detection of *Leishmania* antigens in Kala-azar patients using monoclonal antibodies. *Microbiology and Immunology* 36, 391–400.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 560–563.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA dogs. *Journal of Infectious Diseases* 189, 1729–1733.
- Tafuri, W.L., Genaro, O., Michalick, M.M.S., França-Silva, J.C., Mayrink, W., 1996. Histopathology and immunohistochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 81–89.
- Tafuri, W.L., de Oliveira, M.R., Melo, N.M., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathologic picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* 96, 203–212.
- Talmi-Frank, D., Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Baneth, G., 2006. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 271–276.
- Travi, B.L., Ferro, C., Cadena, H., Montoya-Ierma, J., Adler, G.H., 2002. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Research in Veterinary Science* 72, 83–86.
- Vidor, E., Dereure, J., Praflong, F., Dubreuil, N., Bissuel, G., Moreau, Y., Rioux, J.A., 1991. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Étude d'une cohorte en région cévenole. *Pratique Médicale et Chirurgicale de L'Animale de Compagnie* 26, 133–137.
- Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., Caracappa, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026, 139–143.
- White Jr., A.C.D., McMahon-Pratt, D., 1988. Purification and characterization of an 80-kilodalton membrane protein from *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity* 56, 2385–2391.
- WHO, 1995. Report of the Second WHO Meeting on Emerging Infectious Diseases. WHO/CDS/BVI/95.2, World Health Organization, Geneva.
- Zhang, W.W., Charest, H., Ghedin, E., Matlashewski, G., 1996. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 78, 79–90.

ANEXO D

ATUALIZAÇÃO

AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS

PARA O DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS

E PARASITÁRIAS

Milena de Paiva Cavalcanti, Virginia Maria Barros de Lorena e Yara de Miranda Gomes¹

RESUMO

Os recentes surtos epidêmicos de doenças emergentes e reemergentes têm demonstrado a importância da aplicação de medidas de controle e prevenção. Para que tais medidas sejam eficazes, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico acurados é essencial. Os métodos decorrentes do aprimoramento da biologia molecular e celular têm propiciado a utilização de técnicas diagnósticas que produzem um resultado confiável em poucos minutos ou horas. Os ensaios imunocromatográficos, a PCR e suas variações, a tecnologia de microarranjos de DNA, a citometria de fluxo e a análise do proteoma constituem exemplos. Alguns desses métodos já estão disponíveis em laboratórios, especialmente os da rede privada. Contudo, a interpretação dos resultados requer níveis diferentes de conhecimento, o que torna necessária a capacitação de recursos humanos para sua maior difusão e aproveitamento. Espera-se, portanto, que o surgimento de novas tecnologias resulte no desenvolvimento de novas drogas e terapias e, sobretudo, de métodos diagnósticos que auxiliem a investigação epidemiológica e promovam melhorias na qualidade de vida da população ao se implantar rapidamente o tratamento.

DESCRITORES: Diagnóstico. Biotecnologias. Microrganismos.

INTRODUÇÃO

Muitas doenças infecciosas comuns nos países em desenvolvimento são tratáveis e o acesso às drogas tem diminuído significativamente a mortalidade e a morbidade nas populações (37). Uma intervenção correta, que seja eficaz tanto para os cuidados agudos como para uma fase seguinte de doenças emergentes e

1 Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Recife, PE, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Yara de Miranda Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 10/9/2007. Revisto em: 11/3/2008. Aceito em: 26/3/2008.

reemergentes, depende da detecção rápida e segura do agente patógeno. A recente síndrome respiratória aguda severa (SARS), por exemplo, demonstra a importância do diagnóstico rápido para a tomada de decisões com relação a triagem de pacientes, controle da infecção, tratamento e vacinação, que podem resultar em vida ou morte para a população (79). Além disso, métodos de diagnóstico mais rápidos certamente auxiliarão a vigilância epidemiológica, pois doenças infecciosas que apresentem significantes conseqüências para a saúde pública poderão ser eficientemente controladas se identificadas precocemente. Atualmente o mundo tem voltado as atenções para dengue hemorrágica, febre do Nilo e malária (30, 48).

Além dos esforços para controlar as doenças epidêmicas e endêmicas, ainda existe uma grande preocupação com a detecção de agentes de bioterrorismo. O trágico evento ocorrido nos Estados Unidos em 2001, quando esporos de anthrax foram enviados por via postal, embora tenha sido terrível, teve um efeito positivo para o desenvolvimento de novos métodos de detecção rápida de microrganismos que causam doenças fatais (14). Em um curto período de tempo, cientistas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) desenvolveram com sucesso a PCR em tempo real (*real-time PCR*) para detecção de agentes de bioterrorismo, método esse agora disponível em muitos laboratórios (14).

As técnicas tradicionais de diagnóstico laboratorial incluem os métodos diretos, como a identificação direta do microrganismo por meio da microscopia óptica, e métodos indiretos, como a inoculação de amostras potencialmente infectadas em animais e meios de cultura e a detecção e quantificação de anticorpos e/ou antígenos em espécimes clínicos.

Historicamente, a microscopia óptica tem sido bastante utilizada no diagnóstico das infecções parasitárias por ser um método simples e que não necessita de reagentes e equipamentos sofisticados. A precisão do resultado, no entanto, depende de capacitação adequada do microscopista, tornando-o, em alguns casos, um teste subjetivo.

O cultivo continua sendo o principal método de diagnóstico para doenças bacterianas. Possibilita determinar a sensibilidade microbiana, porém necessita de tempo, muitas vezes crucial para o tratamento do paciente, e de uma infra-estrutura laboratorial mínima, além de meios de cultura especializados, recursos raros em locais onde as infecções são endêmicas (37).

Nos últimos vinte anos, o desenvolvimento dos métodos rápidos de diagnóstico proporcionou um avanço importante, pois os resultados podem ser obtidos em poucas horas ou até mesmo em minutos. A maior parte desses métodos baseia-se na detecção do complexo antígeno-anticorpo. A imunocromatografia tem sido bastante utilizada para diagnóstico em campo. Por outro lado, no laboratório outros métodos imunológicos são utilizados graças à simplicidade da execução, ao baixo custo e à acurácia (51, 59), como se verá mais adiante.

Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente aplicadas no diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias (79). A revolucionária reação

em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* – PCR) reproduz *in vitro* a replicação da molécula de DNA em grande escala e, de todas as técnicas moleculares, esta é considerada a mais desenvolvida (75, 79). Diferentemente dos métodos imunológicos, nos quais se identifica a doença por meio dos anticorpos dirigidos aos microrganismos, os métodos moleculares evidenciam a molécula do DNA na amostra do paciente. Em muitos casos, porém, a detecção da molécula de DNA do microrganismo na amostra clínica não indica, necessariamente, a confirmação da enfermidade (42).

Esta breve atualização discute os principais métodos utilizados para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias e os avanços alcançados com a biologia molecular, principalmente com as técnicas baseadas em PCR. Além disso, são discutidas outras metodologias que se mostram como uma promessa para o diagnóstico no futuro.

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Nos anos 70, as pesquisas para o desenvolvimento de um método simples, porém sensível, para a detecção de antígenos do patógeno ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro levaram ao desenvolvimento do ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (20). O princípio básico da técnica consiste na imobilização de um dos reagentes (anticorpo ou antígeno) em uma fase sólida. Após a adição da amostra, o outro reagente ligado a uma enzima reagirá com o complexo antígeno-anticorpo. Os imunocomplexos são revelados ao adicionar-se o substrato da enzima e um cromógeno formando um produto colorido. Os resultados do ELISA são expressos objetivamente pelas absorvâncias obtidas de espectrofotômetros, não dependendo de leituras subjetivas.

Atualmente várias doenças infecciosas e parasitárias são pesquisadas pelos métodos imunológicos, sobretudo o ELISA (51). Graças à sua simplicidade (possibilidade de automação) pode ser usado para analisar grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. É, portanto, o principal método usado em serviços de hemoterapia para a triagem de doadores (27, 78) e para o diagnóstico etiológico. A principal desvantagem dessa abordagem é a especificidade diminuída, pois a maioria dos conjuntos diagnósticos envolve a pesquisa de anticorpos utilizando extratos totais do organismo adsorvidos à placa (59). Este é um dos problemas verificados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, que apresenta uma importante reação cruzada em soros de pacientes com leishmaniose (3, 36). Uma forma de minimizar a obtenção desses resultados é a utilização de antígenos purificados, recombinantes ou sintéticos. Esses antígenos devem estar presentes em isolados de diferentes áreas endêmicas e ausentes em outros agentes infecciosos; devem ser imunogênicos em populações com diferentes *backgrounds* genéticos, independentemente da fase clínica da doença, além de estáveis e de fácil obtenção (81).

Em inquéritos epidemiológicos, sobretudo para a utilização em campo, a necessidade de testes rápidos para o diagnóstico das doenças contribuiu para o desenvolvimento dos testes do tipo *dipstick*, baseados em ensaios imunocromatográficos. A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeiro criada para o estudo das proteínas séricas (31). Nesses ensaios é utilizada uma matriz de membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato transparente. Para detectar antígeno, emprega-se um anticorpo de captura, ligado à matriz e um anticorpo marcado específico ao antígeno pesquisado. Para detectar anticorpo, utiliza-se um antígeno específico ligado à matriz e um anticorpo anti-imunoglobulina marcado (59). O método *dipstick* fornece resultados qualitativos, rápidos, econômicos e de fácil interpretação; a leitura é feita a olho nu, fazendo-se uma comparação com os controles positivos e negativos (63).

Nas últimas décadas, *dipsticks* foram desenvolvidos para a detecção de muitas doenças infecciosas tais como dengue (2), malária (4), amebíase (8), peste bubônica (13), giardíase (24), leishmaniose visceral (26), hepatite B (61) e infecção por HIV (1), *Legionella pneumophila* (74), *Cryptosporidium parvum* (24), *Helicobacter pylori* (43), *Streptococcus pneumoniae* (18), entre outras. Esses testes são, portanto, de grande valor em situações nas quais os profissionais de saúde necessitem tomar decisões e assumir condutas imediatas como, por exemplo, no início de quimioprofilaxia para HIV em casos de exposição ocupacional a sangue e fluidos corpóreos e de parturientes que não realizaram pré-natal.

Embora os testes imunológicos sejam bastante utilizados na rotina laboratorial, resultados inconclusivos ainda são evidenciados. Nesse sentido, o diagnóstico molecular vem revolucionando a prática clínica das doenças infecciosas (79). Até o início da década de 1970, para os bioquímicos, o DNA era a molécula da célula mais difícil de ser analisada. Hoje a situação mudou de forma significativa. Técnicas como a hibridização, a amplificação e o seqüenciamento de nucleotídeos têm propiciado novos testes para um melhor conhecimento de diversos processos biológicos, alcançando grande importância clínica quando utilizados no diagnóstico laboratorial (22).

MÉTODOS MOLECULARES

Nos últimos anos, a genética, a biologia celular, o seqüenciamento do genoma de patógenos, entre outros recursos, têm mudado de forma significativa as oportunidades para a realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, diagnóstico e controle de doenças microbianas. Em 1983, o desenvolvimento da PCR por Kary B. Mullis (46, 47) foi considerado o grande avanço da biologia molecular. Em razão do alcance da popularidade da técnica, Kary B. Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Esta técnica ampliou as possibilidades da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações até mesmo em áreas fora do seu campo tradicional, tais como

a medicina, a agricultura e a biotecnologia. A ecologia molecular, a arqueologia biomolecular e a ciência forense de DNA são apenas três das novas disciplinas que surgiram como uma consequência direta da invenção da PCR.

A PCR reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ou de sondas que irão hibridizar-se especificamente com a sequência alvo (79). Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo seqüenciados, catálogos de genes podem ser explorados para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em PCR. Como resultado, desde a década passada, encontram-se disponíveis comercialmente muitos ensaios baseados nesta técnica, os quais continuam a expandir-se. Neste contexto, o *Food and Drug Administration* (FDA), agência governamental dos Estados Unidos responsável pela inspeção de produtos médicos e alimentícios, aprovou a utilização de ensaios baseados em PCR para a detecção de vários patógenos como, por exemplo, *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovírus, *Gardnerella vaginalis*, HIV, HPV, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, entre outros (79).

Variações da PCR

Quando se quer utilizar a PCR para a detecção de um agente viral, é importante levar em consideração que os genomas de muitos vírus de importância clínica são compostos de RNA ao invés de DNA. Nesse caso, é necessária a realização da transcrição reversa antes de se iniciar a amplificação por PCR, a qual é realizada tratando-se a amostra com a enzima transcriptase reversa. Esta enzima é capaz de transformar o RNA em um DNA complementar que servirá de alvo para a PCR convencional. A técnica é conhecida como RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*) (79).

A possibilidade de utilização, na mesma reação, de mais de um par de iniciadores com amplificação simultânea de múltiplas seqüências do DNA-alvo é chamada de *multiplex-PCR*. Assim, mais de uma seqüência de DNA, em uma mesma amostra, podem ser amplificadas ao mesmo tempo (7, 12, 25, 53) (Figura 1).

A *nested-PCR* utiliza dois pares de iniciadores para amplificação (Figura 1). O primeiro par é usado para uma primeira reação, na qual os produtos desta reação são submetidos a uma segunda amplificação com um outro par de iniciadores. Essa reamplificação aumenta a sensibilidade e a especificidade da técnica, porém apresenta problemas de contaminação, pois os tubos precisam ser abertos para a adição dos reagentes da segunda reação. Uma forma de contornar essa situação foi a padronização da *nested-PCR* no mesmo tubo (*single tube nested-PCR*), que consiste no seqüestro de um dos componentes da primeira etapa de reação, o qual foi aplicado com sucesso para a detecção do vírus causador da SARS (66).

PCR		
Nested PCR	PCR em tempo real	Multiplex PCR
<ul style="list-style-type: none"> • Reamplificação de uma região interna ao alvo • Maior especificidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de sondas fluorescentes • Mais rápido • Maior sensibilidade • Capacidade quantitativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de mais de um par de iniciadores • Maior sensibilidade

Figura 1. Resumo das variações da PCR e suas principais características.

Um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas foi o desenvolvimento da PCR em tempo real. O sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento do produto amplificado como, por exemplo, a SYBR-Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Uma alternativa é o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da seqüência que se deseja amplificar. Um exemplo desse sistema é a sonda TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp.). À medida que vai ocorrendo a amplificação, a TaqMan vai sendo degradada e há a liberação de um fluorocromo que absorve energia e emite luz (45, 79). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal, que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR. O ciclo em que o limite de negatividade é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (45).

A PCR em tempo real possibilita a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. As vantagens da PCR em tempo real em relação a PCR convencional são inúmeras e incluem: velocidade, reprodutibilidade e capacidade de quantificação (65, 79). Essa tecnologia, que é altamente sensível, já está sendo desenvolvida para fazer o acompanhamento de inúmeras doenças como Aids, hepatite C, toxoplasmose e leishmanioses (23, 29, 38, 39, 40, 49, 52, 62).

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica inovadora, capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento em tempo real do produto amplificado. O sistema de quantificação possui aplicações variadas: identificação de alelos em DNA genômico; análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes; análise de patógenos em alimentos; análise de produtos transgênicos, além de sua aplicação em diagnóstico (50). Muitos alvos podem ser monitorados usando-se fluorocromos com diferentes espectros de emissão. Essa tecnologia altamente sensível é comercialmente disponível com os sistemas TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp.), LightCycler (Roche Diagnostics Corp.) e Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) (52).

Com relação à leishmaniose visceral, a técnica vem sendo utilizada em cães e em pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à

carga parasitária, à interação hospedeiro-parasito e ao monitoramento da terapia (23, 40, 45, 49, 57, 58, 70, 76). Mary et al. (40) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *Leishmania infantum* em amostras de sangue e o estado clínico dos pacientes, permitindo discriminar pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, o que promove o diagnóstico e o monitoramento da terapia com segurança, rapidez e conforto para o paciente.

Estudo recente de Kompalic-Cristo et al. (29) examinou o valor diagnóstico da PCR em tempo real para detectar e quantificar *Toxoplasma gondii* em sangue humano. Concluiu que o sistema é capaz de quantificar, acuradamente, leituras parasitárias de DNA de *T. gondii* em baixas concentrações, podendo verificar um aumento no número de parasitos em indivíduos sorologicamente identificados com toxoplasmose aguda.

Em medicina veterinária, sistemas que utilizam Sybr Green têm sido aplicados, em modelo experimental, para quantificação de *Borrelia burgdorferi* para a doença de Lyme (44) e o diagnóstico da ehrlichiose (19).

Atualmente existem conjuntos diagnósticos disponíveis para a detecção e quantificação de DNA e RNA em amostras clínicas, especialmente desenvolvidos para o acompanhamento de pacientes com HIV e hepatite C (52). Assim como a PCR foi definida por alguns autores como “padrão-ouro”, a quantitativa PCR em tempo-real certamente será a técnica de referência no futuro (40).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação com DNA, e resultados falso-negativos relacionados com a presença de inibidores da PCR (79). Nos resultados falso-positivos, na maioria dos ensaios patógeno-específicos, a fonte predominante de contaminação é derivada de produtos amplificados em reações anteriores que podem ser transmitidos por meio dos reagentes, tubos, pipetas e bancadas. Boas práticas de laboratório e a separação física das áreas de pré-amplificação e pós-amplificação podem reduzir os riscos de contaminação, bem como a descontaminação dos materiais envolvidos na PCR por métodos que destroem o DNA incluindo irradiação ultravioleta, tratamento químico e digestão enzimática (11, 16). Resultados falso-negativos podem decorrer de um volume amostral relativamente abaixo do permissível para a reação, além de problemas associados com o processamento da PCR. Tais obstáculos podem ser superados com tratamento adequado da amostra por meio de uma correta extração e purificação do DNA e remoção dos inibidores da PCR, tais como hemoglobina, componentes da urina como leucócitos, células epiteliais e cristais, entre outros (79).

Nos últimos anos, novas técnicas moleculares de tipificação baseadas na PCR têm propiciado um importante avanço nos estudos de epidemiologia molecular das enfermidades infecciosas (21, 60). Um estudo epidemiológico molecular tem por objetivo determinar a relação clonal existente entre vários isolados de uma mesma espécie (21). Esta informação é muito útil, principalmente quando se produzem surtos epidêmicos causados por cepas multiresistentes, porque permite determinar o número de clones circulantes, identificar a fonte de contaminação, o reservatório e os veículos

de transmissão, avaliar a eficácia das medidas de controle para evitar a disseminação dos clones e diferenciar entre infecção e recidiva. O extraordinário avanço da biologia molecular tem propiciado o desenvolvimento de novos métodos genômicos de tipagem por meio de diversas técnicas, incluindo as baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos, que possuem um elevado poder de discriminação, são mais rápidas e práticas e permitem trabalhar com um maior número de amostras (21).

PERSPECTIVAS FUTURAS

As seqüências descritas de mais de 1.000 vírus e 135 bactérias têm possibilitado o desenvolvimento de testes diagnósticos promissores (37). Esse grande avanço da biologia molecular e celular vem atuando em várias áreas da microbiologia. Os microarranjos de DNA (*DNA microarray*) vêm sendo usados para estudar a expressão dos genes dos agentes infecciosos e do hospedeiro em resposta à infecção e poderá resultar em descobertas de novos biomarcadores da doença ou de novos alvos para o diagnóstico (17). Os microarranjos de DNA são definidos como pequenos suportes sólidos nos quais milhares de sondas estão imobilizadas ou ligadas de forma organizada em posições conhecidas. Usualmente o suporte sólido é uma lâmina de vidro especial de microscopia, mas também pode ser um *chip* de silicone. O DNA é impresso, depositado ou sintetizado diretamente no suporte. Essas sondas podem ser produtos de PCR ou oligonucleotídeos e os alvos podem ser produtos de PCR, DNA genômico, RNA total, RNA amplificado, DNA complementar, DNA plasmidial ou, simplesmente, amostras clínicas (52). Estudos recentes têm mostrado a aplicação dos microarranjos de DNA na identificação de diversos microrganismos: vírus influenza e adenovírus (73, 34), *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (72).

A tecnologia de microarranjos de DNA apresenta-se como um método promissor para detecção de genes de resistência antimicrobiana e resistência mutacional (9). A detecção e identificação de genes de resistência à tetraciclina foram recentemente demonstradas por este método (10). Quando a PCR é usada para detecção de DNA em amostras clínicas, os microarranjos podem ser usados para identificar os produtos amplificados por hibridização com sondas patógeno-específicas (52). Um exemplo desta aplicação é a realização da PCR com iniciadores universais, capazes de detectar múltiplos patógenos simultaneamente e a utilização dos microarranjos para verificar a amplificação de uma bactéria ou vírus específico (32, 35). Adicionalmente, esse modelo vem sendo trabalhado para o desenvolvimento de um método para detecção de anticorpos específicos (*antigen microarrays for serology*). Nesse modelo, um arranjo de proteínas de vários agentes infecciosos estaria disponível para a ligação com anticorpos presentes em soro. Isso possibilitaria uma triagem sorológica completa do paciente. Já foi desenvolvido um microarranjo com antígenos específicos de *Toxoplasma gondii*, citomegalovírus, herpesvírus 1 e 2 e vírus da rubéola, cujos resultados foram favoráveis para a detecção de imunoglobulinas G (77).

A citometria de fluxo, desenvolvida nos anos 50, é um método automatizado para avaliar as propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas e/ou células que fluem numa suspensão líquida. O sistema operacional do citômetro de fluxo é constituído de fontes luminosas do tipo *laser* e de um conjunto de lentes que proporciona a avaliação de múltiplos parâmetros. Células variadas podem ser identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos, que se ligam a antígenos da superfície celular ou intracitoplasmáticos. Quando a célula intersecta o *laser*, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou emissão de fluorescência. O tamanho e a complexidade celular (aspectos morfológicos) são avaliados mediante a dispersão luminosa frontal e lateral, respectivamente. Os sinais fluorescentes são decorrentes da positividade dos antígenos de membrana nas células examinadas que são captados, analisados e quantificados por um programa de computador (67).

A citometria de fluxo tem sido usada para quantificar antígenos virais dentro ou sobre superfícies de células infectadas. Além disso, ácidos nucleicos virais podem ser detectados e quantificados por hibridização *in situ* em suspensões celulares e, simultaneamente, a citometria pode, também, identificar fenotipicamente quais células estão infectadas (52). Isso tem sido utilizado para a pesquisa de muitos vírus, principalmente HIV e citomegalovírus (55).

Uma outra aplicação da citometria de fluxo é a detecção de imunoglobulinas específicas, presentes na amostra graças à utilização de microesferas ligadas aos antígenos dos microrganismos (55). Os anticorpos da amostra são detectados após a adição de um segundo anticorpo conjugado a um corante fluorescente (55). O sistema Luminex®, baseado neste método da citometria de fluxo, foi projetado para atender às necessidades da medicina do laboratório, porém vem sendo também utilizado no ambiente da pesquisa. Dessa forma, vários microrganismos podem ser detectados diretamente pelos citômetros de fluxo (52). Essa tecnologia já tem sido aplicada com sucesso para a identificação de um vasto número de bactérias presentes em sangue, urina, exudatos, bile, lavado brônquico e até em fezes (55). Recentemente, a pesquisa dos anticorpos específicos a HIV (52), vírus sincicial respiratório (69) a *Trypanosoma cruzi* (15, 71), a *Leishmania chagasi* (33), ao *Mycobacterium tuberculosis* (28), *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum* (6), entre outros, tem sido realizada por esta metodologia (52).

A versatilidade da citometria de fluxo propicia um grande número de aplicações na microbiologia clínica e isso poderá ser visto em um futuro próximo. Os aparelhos são agora mais fáceis de utilizar e também mais econômicos. Além disso, segundo Raoult et al. (52), o desenvolvimento de citômetros portáteis poderá facilitar suas aplicações, por exemplo, em aeroportos e portos para a identificação rápida de doenças e a detecção de microrganismos usados como agentes de bioterrorismo.

A análise do proteoma (conjunto de todas as proteínas codificadas do genoma de um organismo) tem criado oportunidades para identificar as proteínas-alvo, que são expressas diferencialmente na saúde e na doença (64). Esses

novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-transducionais, bem como outras informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (56). Atualmente, as principais técnicas utilizadas na proteômica são a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa. O aprimoramento dessas técnicas tem possibilitado a detecção de proteínas com alta sensibilidade e especificidade em pequenos volumes de amostra, como no sangue e na urina (41).

A proteômica tem trazido informações importantes sobre os microrganismos, auxiliando no desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar, eficientemente, algumas doenças em estágios latentes e, assim, facilitar o tratamento e a cura dos pacientes. Proteínas secretadas foram identificadas em isolados clínicos comuns e analisadas como potenciais antígenos para o imunodiagnóstico da tuberculose, mostrando elevada sensibilidade e especificidade (5). Uma triagem sorológica que pudesse detectar a infecção pré-clínica da tuberculose permitiria o tratamento precoce, reduzindo a transmissão da doença. Da mesma forma, por meio da análise do soro de pacientes com a síndrome respiratória aguda severa, foram identificadas proteínas que poderão ser usadas para o diagnóstico (54) e o desenvolvimento de vacinas (80).

Apesar de a maioria dos estudos a respeito da identificação e caracterização de marcadores biológicos específicos estar voltada para o diagnóstico de cânceres, Alzheimer e doenças autoimunes, a análise proteômica poderá ser útil para o diagnóstico precoce de doenças infecciosas e parasitárias e para o acompanhamento da evolução do tratamento. A utilização da espectrometria de massa para o diagnóstico de calicivírus tem sido proposta (68), porém ainda é uma promessa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*), do CPqAM/Fiocruz, pela análise crítica da presente atualização. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Bio-Manguinhos/Fiocruz. Y.M. Gomes é detentora de bolsa de produtividade do CNPq. V.M.B. Lorena recebe bolsa de doutorado do CNPq e M.P. Cavalcanti foi bolsista na categoria doutorado desse mesmo órgão de fomento à pesquisa durante a realização deste trabalho.

ABSTRACT

Biotechnology advances for diagnosis of infectious and parasitic diseases

Recent epidemic outbreaks of emerging and re-emerging diseases have shown the importance of control and prevention measures. In order for such measures to be effective, the development of accurate diagnostic methods is relevant. Tools arising from improvements in molecular and cell biology have allowed for diagnostic techniques that produce reliable results in minutes or hours. Immunochromatographic assays, PCR and its variants, technology involving DNA

micro-arrays, flow cytometry, and proteome analysis are some examples. Some of these methods are already available in laboratories, especially in the private sector. However, the interpretation of results requires new levels of knowledge. There is, therefore, a need to train staff to ensure that these methods are more widely known and made use of. It is thereby expected that the emergence of new technologies will result in the development of new drugs and treatments, and especially in diagnostic methods for epidemiological investigations, and will lead to improvements in the quality of life of the population, as treatment will be able to be started promptly.

KEY WORDS: Diagnosis. Biotechnology. Microorganisms.

REFERÊNCIAS

1. Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JA. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol* 39: 2572-2575, 2001.
2. Allwinn R, Schiefertain C, Clauke S, Doerr HW. Rapid diagnostic of primary dengue fever by the immunochromatographic test and by electron microscopy-a case report. *Infection* 27: 365-367, 1999.
3. Anderson J. Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. *Trends in Parasitol* 20: 52-53, 2004.
4. Araz E, Tanyuksel M, Ardic N, Tabuk C. Performance of a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of vivax malaria in Turkey. *R Soc Trop Med Hyg* 94: 55-56, 2000.
5. Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN, Kim YS. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4: 3299-3307, 2004.
6. Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, Casaqui-Carollo MC, Graczyk TK, Slemenda S, Johnston SP, da Silva AJ. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. *J Clin Microbiol* 45: 2835-2840, 2007.
7. Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, Dicesare JL, Haff L, Atlas RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 4: 353-365, 1990.
8. Bhaskar S, Singh S, Sharma M. A single-step immunochromatographic test for the detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. *J Immunol Methods* 196: 193-198, 1996.
9. Bodrossy L, Sessitsch A. Oligonucleotide microarray in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 7: 245-254, 2004.
10. Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microassays. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3290-3295, 2003.
11. Carrol NM, Adamson P, Okhravi N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* 37: 3402-3404, 1999.
12. Chamberlain JL, Gibbs RA, Rainier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156, 1988.
13. Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Rasolomaharo M, Biosier P, O'Brien T, Aldrich J, Keleher A, Morgan C, Burans J. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assays and rapid immunogold dipstick. *Int J Med Microbiol* 290: 279-283, 2000.
14. Cockerill FR III, Smith TF. Response of clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. *J Clin Microbiol* 42: 2359-2365, 2004.
15. Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Da Costa Rocha MO, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 112-118, 2001.

16. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox A. Contamination and sensitivity issues with a real time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 38: 1747-1752, 2000.
17. Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis* 8: 13-525, 2000.
18. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedrosa P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 119: 243-249, 2001.
19. Edelman DC, Dumler JS. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. *Mol Diagn* 1: 41-49, 1996.
20. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874, 1971.
21. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22: 355-360, 2004.
22. Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico imunológico das principais doenças infecciosas e parasitárias*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
23. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego, Alberola J, Ferrer L, Aánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137: 214-221, 2006.
24. Garcia LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC Combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol* 38: 1267-1268, 2000.
25. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 32: 1768-1772, 1994.
26. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 669-670, 1999.
27. Katti MK. Are enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot assay independent in immunodiagnosis of infectious disease? *Clin Infect Dis* 32: 1114, 2001.
28. Khan IH, Ravindran R, Yee J, Ziman M, Lewinsohn DM, Genaro L, Flynn JL, Goulding CW, DeRiemer K, Lerche NW, Luciw PA. Profiling Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) by Multiplex Microbead Suspension Arrays for Serodiagnosis of TB. *Clin Vaccine Immunol*. 2008, (in press).
29. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 101: 619-625, 2007.
30. Kortepeter MG, Parker W. Potential biological weapons threats. *Emerg Infect Dis* 5: 523-527, 1999.
31. Kohn J. An immunochromatographic technique. *Immunol* 15: 863-865, 1968.
32. Kricka LJ. Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin Biochem* 26: 325-331, 1993.
33. Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SFG, Rocha RDR, Pissinate JF, Martins-Filho AO, Dietze R. Detection of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* Immunoglobulin G by Flow Cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 14: 569-576, 2007.
34. Lin B, Wang Z., Vora GL, Thornton JA, Schnur JM, Thach DC, Blaney KM, Ligler AG, Malanoski AP, Santiago J, Walter EA, Agan BK, Metzgar D, Seto D, Daum LT, Kruzelock R, Rowley RK, Hanson EH, Tibbetts C, Stenger DA. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 16: 527-535, 2006.
35. Liu W, Mirzabekov AD, Stahl DA. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ Microbiol* 3: 619-629, 2001.
36. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
37. Mabey D, Peeling RW, Uowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2: 231-240, 2004.

38. Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 142: 271-280, 2006.
39. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2007 (In press).
40. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249-5255, 2004.
41. Marshal GM, Kavallaris M. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *The Med J Aust* 182: 575-579, 2005.
42. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 189: 1018-1023, 2004.
43. Miwa H, Akamatsu S, Tachikawa T, Sogabe T, Ohtaka K, Nagahara A, Sugiyama Y, Sato N. On-site diagnosis of *H. pylori* infection by urine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39: 95-97, 2001.
44. Morrison TB, Ma Y, Weis JH, Weis JJ. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescence monitoring of PCR. *J Clin Microbiol* 37: 987-992, 1999.
45. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. *Parasitol* 46: 163-167, 2004.
46. KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
47. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-65, 1990.
48. Nichol ST, Arikawa J, Kawaoka Y. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12411-12412, 2000.
49. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Leishmania in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol* 40: 1666-1669, 2002.
50. Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13, 2004.
51. Perusk AH, Peruski LF. Immunological methods for detection and Identification of Infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diag Lab Immunol* 10: 506-513, 2003.
52. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2: 151-159, 2004.
53. Rea S, Chikuni K, Branciari R, Sangamayya RS, Ranucci D, Avelline P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *J Dairy Res* 68: 689-698, 2001.
54. Ren Y, He QY, Fan J, Jones B, Zhou Y, Xie Y, Cheung C, Wu A, Chiu J, Peiris JSM, Tam PKH. The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. *Proteomics* 4: 3477-3484, 2004.
55. P, Crapoulet N, Ogata H, La Scola B, Vestris G, Claverie J, Raoult D. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii*. *Lancet* 362: 447-449, 2003.
56. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM, Grossi-De-Sá MF. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico* 136, Embrapa, 2005.
57. Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 90: 1150-1154, 2004.
58. Roura X, Sanchez L, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 144: 262-264, 1999.
59. Sanchez MCA. Testes sorológicos. In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
60. Schwarz S, Blinckwede M, Kehrenberg C, Michael GB. Phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of veterinary important bacterial pathogens of the genera *Staphylococcus*, *Salmonella*, and *Pasteurella*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116: 401-416, 2003.

61. Shin HS, Kim CK, Shin KS, Chung HK, Heo TR. Pretreatment of whole blood for use in immunochromatographic assays for hepatitis B virus surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 9-13, 2001.
62. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147: 315-319, 2007.
63. Spielberg F, Kassler WJ. Rapid testing for HIV antibody: a technology whose time has come. *Ann Intern Med* 125: 509-511, 1996.
64. Suresh S, Huhan S, Meshra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, Pandey A. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. *Gene* 364: 13-18, 2005.
65. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmvoll S, Littauer P, Dahl K H. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 112: 815-837, 2004.
66. Tao SC, Jiang D, Lu HL, Xing WL, Zhou YX, Cheng J. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. *Biotechnol Lett* 26: 179-183, 2004.
67. Traganos F. Flow cytometry: Principles and applications. *Cancer Invest* 2: 239-258, 1994.
68. Utagawa E, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T. Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J Virol Methods* 100: 49-56, 2002.
69. Vieira SE, Glio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. *Clinics* 62: 709-716, 2007.
70. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-Based Detection of *Leishmania infantum* DNA Using Canine Samples. *New York Acad Sci* 1026: 139-143, 2004.
71. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Teixeira-Carvalho A, Martins NE, Dias JCP, Rassi A, Luquetti AO, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods* 318: 102-112, 2007.
72. Wang Z, Vora GJ, Stenger DA. Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 42: 3262-3271, 2004.
73. Wang Z, Daum LT, Vora GJ, Metzgar D, walter EA, canas LC, Malanoski AP, Lin B, Stenger DA. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. *Emerg Infect Dis* 12: 638-648, 2006.
74. Weaver PC, Yzenman EP, Kuijper KJ, Speeman P, Dankert J. Rapid diagnosis of Legionnaires disease using an immunochromatographic assays for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in The Netherlands. *J Clin Microb* 38: 2738-2739, 2000.
75. Weng L, Rubin EM, Bristow J. Application of sequence-based methods in human microbial ecology. *Genome Res* 16: 316-322, 2006.
76. Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, Ryan JR. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 148-151, 2004.
77. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271, 1987.
78. Wright PF, Nilsson EMV, Rooij ML, Jeggo MH. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech* 12: 435-450, 1993.
79. Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infections diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet* 4: 337-348, 2004.
80. Ying W, Hao Y, Zhang Y, Peng W, Qin E, Cai Y, Wei K, Chang JWG, Sun W, Dai S, Li X, Zhu Y, Li J, Wu S, Guo L, Dai J, Wang J, Wan P, Chen T, Du C, Li D, Wan J, Kuai X, Li W, Shi R, Wei H, Cao C, Yu M, Liu H, Dong F, Wang D, Zhang X, Qian X, Zhu O, He F. Proteomic analysis on structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proteomic* 4: 492-504, 2004.
81. Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Colli W. Use of recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 519-522, 1990.

ANEXO E

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

The Veterinary Journal xxx (2008) xxx–xxx

The
Veterinary Journalwww.elsevier.com/locate/tvj

Short Communication

The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood

Milena de Paiva Cavalcanti^a, Maria Edileuza Felinto de Brito^a, Wayner Vieira de Souza^b, Yara de Miranda Gomes^{a,*}, Frederico G.C. Abath^a

^a Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brazil

^b Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brazil

Accepted 26 May 2008

Abstract

Recent research has demonstrated the high sensitivity of real time PCR (qPCR) in the diagnosis of *Leishmania infantum* infection. The goal of this study was to develop and evaluate a qPCR detection system for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) in dogs. Specific primer sets were developed for the *Leishmania donovani* complex, in which a fragment of 132 bp of kDNA from *L. infantum* was amplified. The reaction was performed using the ABI PRISM 7000 system with ABI PRISM software used to carry out the analysis. When canine blood samples were assessed using this system the detection limit of the method was found to be 0.07 parasites per reaction, the efficiency was 94.17% ($R^2 = 0.93$, slope = -3.47) and the sensitivity and specificity were 100% and 83.33% respectively. The use of such a sensitive, reproducible and rapid qPCR-based assay will be useful in the diagnosis and control of *L. infantum* infection in endemic areas, where serological surveys often underestimate true disease prevalence.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum*; Real-time PCR (qPCR); Diagnosis

Visceral leishmaniasis (VL) is the most clinically severe form of leishmaniasis, and is frequently fatal if untreated. Early diagnosis is important in preventing severe illness and the emergence of molecular detection techniques raises the potential of revolutionising pathogen detection in clinical specimens (Zarlenga and Higgins, 2001).

With real-time PCR (qPCR) technology, monitoring of amplification of specific DNA sequences occurs as the reaction proceeds. Benefits of this methodology include rapid result turnaround and reduced risk of sample contamination causing false positive results. Studies by Nicolas et al. (2002) and Svobodová et al. (2003) have confirmed the potential of qPCR in quantifying parasite loads in tissue biopsies and in the current study we report the development

of a sensitive, qPCR detection method for *L. infantum* in dog blood, with a view to using the method routinely in the diagnosis of VL.

Blood samples were taken from 78 dogs in Pernambuco, Brazil. For the purposes of the study two groups of animals were defined. The first (group 1) had clinical evidence of VL and were either positive on parasitological examinations for leishmania (bone marrow puncture and skin scrapings) or were ELISA positive (EIE-Leishmaniose Canina Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) and had epidemiological links with the disease (such as contact with affected animals or coming from a leishmaniasis-endemic area). The second control group (group 2) comprised dogs that had never visited a leishmaniasis-endemic area, had not received a blood transfusion and were serologically negative on both ELISA and indirect immunofluorescence tests (LVC Bio-Manguinhos/FIOCRUZ).

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012559; fax: +55 81 21012640.
E-mail address: yara@cpqam.fiocruz.br (Y. de Miranda Gomes).

Blood samples were collected in EDTA tubes (EDTA 0.009 g/5 mL of blood) and were stored at -80°C . Sampling procedures were in line with International Guiding Principles for Biomedical Research Involving The Use of Animals and the study protocol was approved by The Ethics Committee for the use of animals of FIOCRUZ-RJ, Brazil.

DNA was extracted from the blood samples using the GenomicPrep blood DNA isolation kit (GE Healthcare) firstly in accordance with the manufacturer's instructions, and secondly by adding proteinase K (5 U/mL) and repeating the protein precipitation step.

Using the sequence NCBI Accession number Z35273.1 of *L. infantum*, specific primers were designed (Linf.1-23F: 5'-TCCCAAACCTTTCTGGTCCT-3' and Linf.1-154R: 5'-TTACACCAACCCCAAGTTTC-3') to amplify a 132 bp fragment (Tm 81°C).

A dilution series of standard DNA from *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) (0.01 fg–1000 ng) was used to evaluate the limit of detection of the system. Test specificity was assessed using 100 pg DNA samples from isolates of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* (Table 1). Specificity (σ) was defined by the equation: $\sigma = (1 + \epsilon)^{\Delta\text{Ct}}$, where the efficiency of amplification (ϵ) was defined as: $\epsilon = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ (Too, 2003).

Real-time PCR was carried out using the ABI PRISM 7000 system (Applied Biosystems). The 50 μL reactions included a 2 μL sample of DNA, 3 pmoles of each primer and 25 μL of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The reaction was performed with an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification ($95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$, $60^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$). Non-template controls (NTC) and quantitative standards were included. ABI PRISM software (version 1.1) was used for result analysis.

To assess intra-assay precision, *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) organisms at concentrations from 10 fg (7×10^{-2} parasites) to 10 ng (7×10^4 parasites) were processed in duplicate. The experiment was repeated five times to assess reproducibility and inter-assay precision was mea-

Table 1
Isolates of *Leishmania* spp. used to verify the specificity of the real-time PCR assay

Species	WHO code
<i>L. donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
<i>L. infantum</i>	MHOM/TN/1980/IPT1
<i>L. lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426
<i>L. amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH 8
<i>L. mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL 21
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. panamensis</i>	MHOM/PA/1971/L5 94
<i>L. major</i>	MRHO/SU/1959/P-strain
<i>L. tropica</i>	MHOM/SU/1958/Strain OD
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. naiffi</i>	MDAS/BR/1990/M5533
<i>L. shawi</i>	IWHI/BR/1999/M17904
<i>T. cruzi</i>	Strain y ^a

^a Trypomastigote and epimastigote forms.

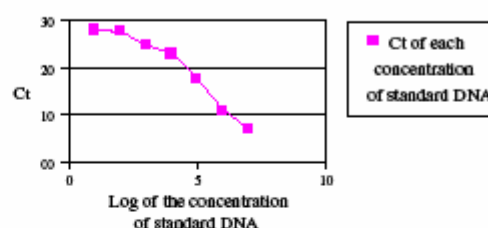


Fig. 1. A standard curve of the log concentration of *L. infantum* DNA. Ct, (cycle threshold); $R^2 = 0.931$; slope = 3.47.

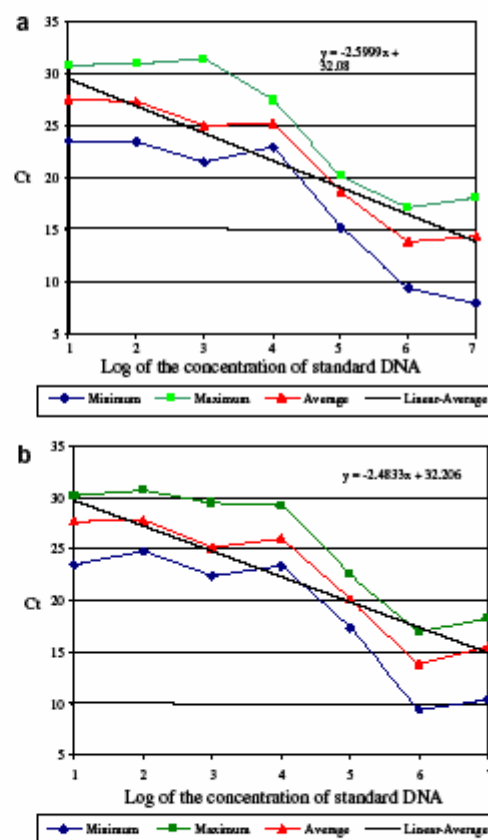


Fig. 2. Linear analysis of maximum, minimum and average Ct (cycle threshold) value of each log concentration of standard DNA where graph A represents sample values ($y = -2.5999x + 32.08$) and graph B the duplicates ($y = -2.4833x + 32.206$). Confidence intervals (A: $B_0 = 27.25$; $B_1 = -3.7$; -1.5 , B: $B_0 = 26.81$; $B_1 = -3.7$; -1.3), showed no significant inter-assay variation.

ARTICLE IN PRESS

M. de Paiva Cavalcanti et al. / The Veterinary Journal xxx (2008) xxx-xxx

3

sured using Microsoft Office Excel 2003 with confidence intervals generated with the help of SPSS for Windows 8. Sensitivity and specificity were calculated by the method of Ferreira and Ávila (2001). Canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a 'house-keeping' gene (Solano-Gallego et al., 2007).

Twenty-one dogs matched the defined VL diagnostic criteria (group 1). Twelve animals were classified as controls (group 2). Given that DNA extraction, as carried out according to manufacturer's instructions, was not capable of distinguishing group 1 from group 2 dogs, the protocol was successfully modified. A standard curve was linear over at least 7 log ranges of DNA concentrations, resulting in a detection limit of 10 fg of *L. infantum* DNA (Fig. 1), equivalent to 0.07 parasites. The system functioned best in the range 7×10^{-2} to 7×10^4 parasites per reaction. Intra-assay analysis demonstrated good homogeneity. In terms of reproducibility, analysis by linear regression (trend line) (Fig. 2) and confidence intervals indicated no significant differences between assays. The system was capable of detecting between 10 and 100 copies of target DNA per reaction ($\epsilon = 0.9417$, $R^2 = 0.931$ and slope = 3.47).

As expected, and in agreement with the alignment step (data not shown), the PCR system also amplified *L. donovani* ($\sigma = 3.58$), *L. major* ($\sigma = 144.65$) and *L. mexicana* ($\sigma = 635.66$) DNA. Other isolates of *Leishmania* and *T. cruzi* (Table 1) produced less fluorescence than NTC. All blood samples were positive for the GAPDH housekeeping gene. Dogs classified as VL cases (group 1) were all found to be positive by the qPCR assay for the *L. donovani* complex with a sensitivity of 100%. The parasite load was quantified in these samples and varied from 50.75 to 2.00×10^{-3} parasites/300 mL of blood. Of the 12 dogs in the control group, 10 were negative and two were positive indicating a test specificity of 83.33%. When the assays were analysed separately, the limit of detection limit varied from 1 to 10 fg, over the five experiments. The standard curve maintained linearity in all assays.

In this study we have developed a highly sensitive, reproducible and rapid qPCR-based assay that will be useful in the diagnosis and control of *L. infantum* infection in

endemic areas, where serological surveys often underestimate true disease prevalence.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

We wish to acknowledge Dr. Fred Abath, for all the confidence and knowledge he gave us, which, even in his absence, has enabled us to complete our research. We also wish to acknowledge the financial support of FIOCRUZ internal funds (PDTIS). F.G.C. Abath and Y.M. Gomes are recipients of CNPq research fellowships. Paiva Cavalcanti received a CNPq Ph.D. scholarship during this project.

References

- Ferreira, A.W., Ávila, S.L.M., 2001. Sorologia: Importância e parâmetros. In: Ferreira, A.W., Ávila, S.L.M. (Eds.), Diagnóstico imunológico das principais doenças infecciosas e parasitárias, second ed. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Guanabara Koogan, pp. 1-8.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1666-1669.
- Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 147, 315-319.
- Svobodová, M., Votýpka, J., Nicolas, L., Volf, P., 2003. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and Infection* 5, 361-364.
- Too, H.P., 2003. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 114, 146-154.
- Zarlenga, D.S., Higgins, J., 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 1, 215-230.

ANEXO F



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

Memo nº 014 /08

Recife, 09 de Junho de 2008

Para: Dra Maria Elza Possas
Coordenadora de Gestão Tecnológica – GESTEC

De: Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Ref.: *Solicitação de análise de patenteabilidade da pesquisa*

Prezada Drª Maria Elza,

Venho através deste solicitar análise de patenteabilidade da pesquisa intitulada "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA INFEÇÃO POR LEISHMANIA INFANTUM", cujos inventores são: Milena de Paiva Cavalcanti, do Departamento de Imunologia/CPqAM; Frederico Guilherme Coutinho Abath, do Departamento de Imunologia/CPqAM (falecido); Yara de Miranda Gomes, do Departamento de Imunologia/CPqAM; Wayner Vieira de Souza, do Departamento de Saúde Coletiva/CPqAM, e Maria Edileuza Felinto de Brito, do Departamento de Imunologia/CPqAM.

Encaminhamos em anexo, o formulário de Notificação de Invenção devidamente preenchido pelos respectivos inventores.

Atenciosamente,

Milena de Paiva Cavalcanti
Milena de Paiva Cavalcanti

Tecnologista – Matrícula 1554967

Com o de acordo da diretoria da unidade:

Edoardo Freese de Carvalho
Dr. Eduardo M. Freese de Carvalho
Diretor
CPqAM/FIOCRUZ
Mat. SIAPE 6759974