

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

LEANDRO BATISTA WANDERLEY

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS  
*PRIMERS* RV1 E RV2 PARA O DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

RECIFE  
2011

**LEANDRO BATISTA WANDERLEY**

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS RV1 E RV2 PARA O  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Fábio Lopes de Melo

Co-orientador: Zulma Maria de Medeiros

Recife

2011

---

W245a Wanderley, Leandro Batista.

Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral / Leandro Batista Wanderley. — Recife: L. B. Wanderley, 2011.

61 f. : il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: Fábio Lopes de Melo; Co-orientadora: Zulma Maria de Medeiros.

1. Leishmaniose visceral. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Especificidade. 4. Primers do DNA. I. Melo, Fábio Lopes de. II. Medeiros, Zulma Maria de. III. Título.

CDU 616-002.5

---

**LEANDRO BATISTA WANDERLEY**

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS RV1 E RV2 PARA O  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Fábio Lopes de Melo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/  
FIOCRUZ

---

Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz  
Universidade de Pernambuco

---

Dra. Milena Paiva Cavalcanti  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, por estar sempre me iluminando e guiando meus passos.

Aos meus pais, Irene e Marcus, por toda a preocupação e investimento na minha educação, muito obrigado por me mostrarem a importância disso. Gostaria de agradecer também pelo amor, carinho e atenção dados durante todo o meu processo de aprendizado, sem vocês não teria chegado onde estou.

Aos meus irmãos, Danillo e Marcus Túlio, por todo o companheirismo e amor compartilhados durante todos esses anos, meu muito obrigado!

Ao meu orientador, Fábio Melo, pela confiança, paciência, atenção e todos os conhecimentos compartilhados desde a monografia, e agora na dissertação, tenho certeza de que o que aprendi nestes anos será muito importante para o meu futuro como profissional.

À minha co-orientadora e “mãe-científica”, Zulma Medeiros, por ter me apresentado o mundo científico durante a graduação. Muito obrigado também por todos os conselhos e confiança depositados em mim, não esquecerei de todo o aprendizado que obtive nestes anos.

À minha amiga e companheira de mestrado, Priscila Castanha, por toda a ajuda dada durante estes dois anos de estudo, tenha certeza de que todo o carinho, atenção, amizade e confiança que tínhamos só aumentou neste período. MUITÍSSIMO obrigado Cocada! =D

A todos os que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Doenças Transmissíveis, em especial à Meri, Rafa, Mila, Luh, Mirelinha, Cynthia, Lidya, Elaine, Gabi e Ju Carnaval, pela ajuda e por fazerem meus dias no laboratório mais divertidos e descontraídos.

Aos queridos amigos que ganhei nestes anos de convívio no Aggeu, especialmente Edu, Paula, Paulinha, Zezé, Socorro, Rosângela, Karol, por toda a atenção, ajuda e pelos momentos de descontração compartilhados.

As minhas amigas-irmãs Adriane, Bruna, Juliana e Michelle, pela atenção, carinho, apoio, incentivo, e também pelo laço de amizade que formamos desde a faculdade e que, graças a Deus, mantemos até hoje. Tenham a certeza de que vocês são a família que eu escolhi, e que podem contar comigo sempre, assim como sei que posso contar com vocês.

Aos pesquisadores do Departamento de Parasitologia, em especial Luiz Dias, Paulo Sérgio e Ana Maria Aguiar, pela atenção, ensinamentos passados e momentos de descontração vividos.

Aos laboratórios de Microbiologia, Leishmanioses, Imunoepidemiologia, Serviço de Referência Nacional em Filarioses e Serviço de Referência em Esquistossomoses, pela doação dos organismos utilizados neste trabalho.

A toda minha turma do Mestrado Acadêmico, pelo companheirismo durante este período.

Ao Mestrado Acadêmico do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo ensinamento compartilhado.

À toda a Secretaria Acadêmica, por toda a atenção e ajuda.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não devemos ter medo dos confrontos... até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas.”*

Charles Chaplin

WANDERLEY, Leandro Batista. Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma endemia de grande expansão geográfica e, na maioria das áreas endêmicas, co-existe com outras doenças. No Brasil há descrição, em vários municípios, de co-endemias tais como esquistossomose, tuberculose, doença de chagas e leishmaniose tegumentar americana, e estas apresentam manifestações clínicas semelhantes à LV, o que pode interferir na especificidade dos métodos diagnósticos convencionais. O minicírculo do kDNA é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas da leishmaniose humana. Dentre os *primers* que tem o kDNA como alvo estão o RV1 e RV2, que já foram aplicados com sucesso em diversas amostras biológicas. Este trabalho teve como objetivo estudar a especificidade dos primers RV1 e RV2, através da técnica de PCR, utilizando DNA de diferentes organismos. Para isto, utilizou-se a ferramenta Primer-BLAST (NCBI), para observar, teoricamente, quais os organismos que possuem regiões para o anelamento dos primers; e, em laboratório, foram testados DNA genômico purificado de diversos organismos. A sensibilidade dos primers foi testada através de uma curva de diluição seriada utilizando o DNA genômico de *Leishmania (Leishmania) chagasi* para dois sistemas de volumes diferentes. O Sistema de PCR 2, com 50 µL, apresentou uma sensibilidade de 0,1fg, enquanto que o Sistema de PCR 1, com 25 µL, alcançou apenas 1 pg. Testando os primers dos sistemas de forma teórica (Primer-BLAST), estes mostraram-se específicos para *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*. Porém ao testar, em laboratório, o DNA dos organismos com o sistema de PCR 2, observou-se inespecificidade dos *primers*, que se anelaram frente ao DNA de *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, para as mesmas condições de ciclagem. Os resultados encontrados demonstram que os *primers* RV1 e RV2 não devem ser utilizados em regiões onde estes parasitos estão presentes, pois podem levar a resultados falso-positivos.

**Palavras chaves:** Leishmaniose visceral; Reação em Cadeia da Polimerase; Especificidade; *Primers* do DNA

WANDERLEY, Leandro Batista. Evaluation of the specificity of primers RV1 e RV2 for molecular diagnosis of Visceral Leishmaniasis. 2011. Dissertation (Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

### ABSTRACT

The Visceral Leishmaniasis (VL) is endemic to a large geographic spread and, in most endemic areas, co-exist with other diseases. In Brazil there are descriptions, in various municipalities, of co-endemic diseases such as schistosomiasis, tuberculosis, chagas disease and american tegumentary leishmaniasis, and those with clinical symptoms similar to VL, which can interfere with the specificity of conventional diagnostic methods. The minicircle kDNA is the target most studied and applied in research of human leishmaniasis. Among the primers that target the kDNA, are RV1 and RV2, which has already been successfully applied in various biological samples. This work aimed to study the specificity of the primers RV1 and RV2, by PCR, using DNA from different organisms. For this, we used the Primer-BLAST tool (NCBI), to observe, theoretically, which organisms have regions for annealing of primers, and in the laboratory were tested purified genomic DNA of various organisms. The sensitivity of primers was tested by a serial dilution curve using genomic DNA from *Leishmania (Leishmania) chagasi* for two systems with different volumes. The PCR System 2, with 50 µL, showed a sensitivity of 0.1 fg, whereas the PCR System 1, with 25 µL, reached only 1 pg. Testing primers in a theoretical way (Primer-BLAST), they showed specificity for *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) donovani* and *Leishmania (Leishmania) infantum*. But when testing, in laboratory, the DNA of the organisms using the PCR system 2, was observed inspecificity of the primers, which showed amplification against the DNA of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*, using the same cycling conditions. The results show that the primers RV1 and RV2 must not be used in regions where these parasites are present, because they may lead to false positive results.

**Keywords:** Visceral Leishmaniasis; Polymerase Chain Reaction; Specificity; DNA primers

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no Velho e no Novo Mundo.....	14
<b>Figura 2</b> - Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> .....	15
<b>Figura 3</b> – Fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> , principal vetor da LV.....	17
<b>Figura 4</b> – Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> .....	18
<b>Figura 5</b> - Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania sp.</i> composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos .....	23
<b>Quadro 1</b> - Procedência dos organismos para a extração de DNA.....	32
<b>Quadro 2</b> - Mix dos reagentes utilizados nos Sistemas de PCR.....	35
<b>Figura 6</b> – Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR simples (protocolo de 25µl) utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de <i>L. (L.) chagasi</i> com os primers RV1 e RV2. ....	38
<b>Figura 7</b> – Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR simples (protocolo de 50µl) utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de <i>L. (L.) chagasi</i> com os primers RV1 e RV2. ....	39
<b>Figura 8</b> - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade da PCR.....	41
<b>Figura 9</b> - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade da PCR.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DAT	Teste de Aglutinação Direta
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IFI	Imunofluorescência Indireta
kDNA	DNA do cinetoplasto
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institute of Health
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
pmoles	Picomoles
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	RNA ribossomal
RNAg	RNA guia
rK39-ICT	Teste imunocromatográfico rápido rK39
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
TAE	Tris-Acetato EDTA

## SUMÁRIO

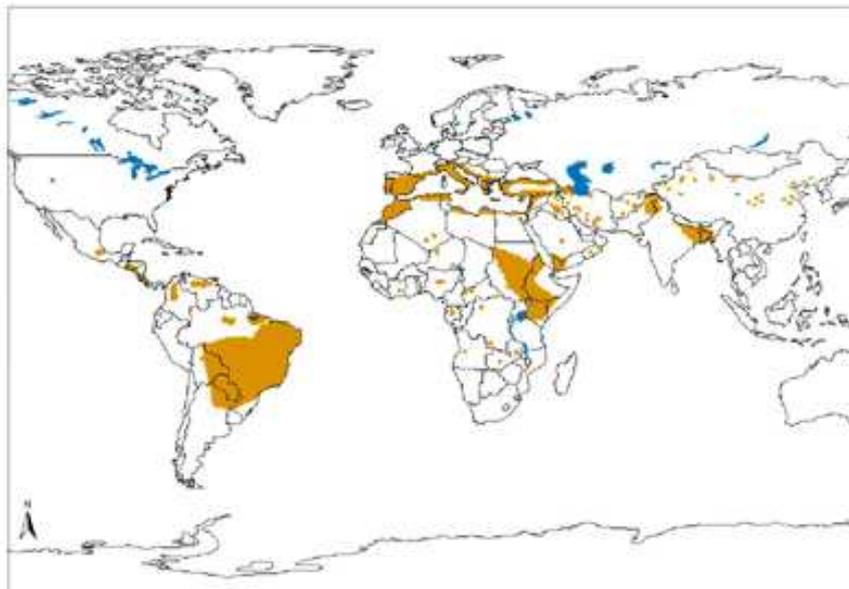
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral.....	14
1.2 Co-endemicidade .....	18
1.3 Diagnóstico laboratorial .....	19
1.3.1 Diagnóstico parasitológico .....	19
1.3.2 Diagnóstico sorológico .....	200
1.3.3 Diagnóstico molecular baseado em PCR.....	21
1.3.3.1 <u>Alvos utilizados em PCR</u> .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Procedência das amostras .....	32
4.2 Extração e purificação do DNA.....	33
4.3 Análise e quantificação do DNA total .....	34
4.4 Avaliação da sensibilidade dos primers.....	34
4.5 Avaliação da especificidade dos primers.....	35
4.6 Análise dos produtos de PCR .....	36
4.7 Considerações éticas.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1. Avaliação da sensibilidade dos primers .....	38
5.2. Avaliação teórica e experimental da especificidade dos primers .....	40
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>58</b>

*Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é uma endemia de grande expansão geográfica, no velho e no novo mundo, que ocorre em países das regiões tropicais, subtropicais e no Mediterrâneo (Figura 1) (BRASIL, 2009; CHAPPUIS *et al.*, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Devido a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados, em crianças desnutridas e em infectados pelo vírus do HIV, a LV foi considerada uma das seis doenças mais importantes do mundo causadas por protozoários (BRASIL, 2009; SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006).



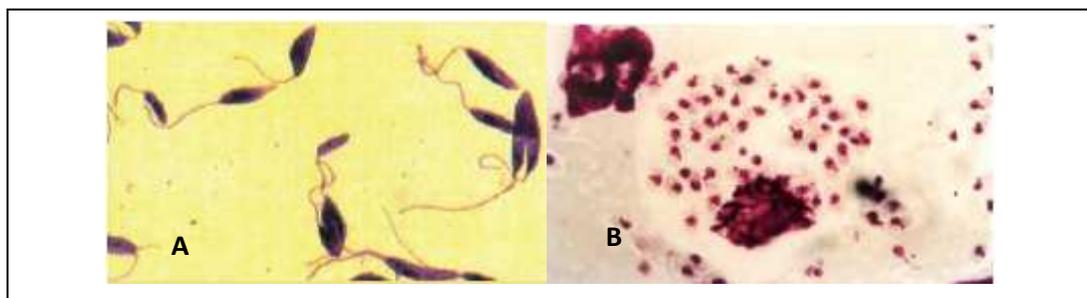
**Figura 1** – Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no Velho e no Novo Mundo.  
Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010a).

A doença afeta, anualmente, aproximadamente 500.000 pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b) em 69 países em todos os continentes, causando cerca de 50 mil mortes por ano, sendo cinco países responsáveis por 90% dos casos: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (FAUCHER; PIARROUX, 2010).

No Brasil, inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, hoje, encontra-se em franca expansão para grandes centros, estando distribuída em 21 unidades da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, o país apresentou uma média anual de 3.379 casos e uma incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes, com uma letalidade média de 6,3% (BRASIL, 2009).

A LV é mais frequente em crianças menores de 10 anos (BRASIL, 2009), principalmente na faixa etária de um a quatro anos, e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (BRASIL, 2009; LUZ; AGUIAR-SANTOS, 2005). Seu espectro clínico pode se apresentar desde a forma assintomática, até ser expresso por episódios febris associados a hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos (BRASIL, 2009). A evolução da doença é lenta, podendo levar os pacientes a complicações graves (GONTIJO; MELO, 2004).

Os agentes etiológicos da doença são protozoários tripanossomatídeos, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, que possuem uma forma flagelada ou promastigota (Figura 2A), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota (Figura 2B), encontrados parasitando macrófagos nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2006).



**Figura 2** - Formas evolutivas da *Leishmania*.

Fonte: Brasil (2006).

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

Estes protozoários pertencem ao gênero *Leishmania* e fazem parte do complexo *Leishmania donovani*, estando inclusas três espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (LUKES et al., 2007), sendo *L. (L.) chagasi* a espécie responsável pela doença nas Américas (BRASIL, 2009; DOURADO et al., 2007).

Existem várias hipóteses acerca da taxonomia do agente causal desta endemia nas Américas. Alguns autores acreditam que as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* são idênticas, sendo provenientes da Europa durante a colonização portuguesa e espanhola (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990). Em contrapartida, outros autores afirmam que a *L. (L.) chagasi* já estava presente no Continente Americano antes da colonização pelos europeus (LAINSON; RANGEL, 2005).

Existem duas linhas de pensamento em relação à taxonomia do gênero *Leishmania*. Através de dados genéticos e enzimáticos, a primeira linha de pensamento considera que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* representam a mesma espécie (LUKES et al., 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000) e, por isso, devem ser utilizadas como sinônimas. A segunda linha considera que esses parasitos são espécies diferentes, e decidiram separá-los em duas subespécies, atribuindo os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005; 2006), estando esta nomenclatura correta (SHAW, 2006).

Esta separação de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* em duas subespécies é - em parte - aceitável, contudo, estas devem ser consideradas sinônimas até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta (DANTAS-TORRES, 2006a; LUKES et al., 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000). Por isso, no presente trabalho adotaremos a nomenclatura *L. (L.) chagasi* como o agente causador da LV nas Américas.

A transmissão da LV pode dar-se de humano para humano, ou de um reservatório animal, principalmente canídeo, para humanos através da picada de insetos vetores pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. (GONTIJO; MELO, 2004). Outras vias potenciais de transmissão relatadas são: congênita, transfusional (ANTINORI et al., 2007; PAGLIANO et al., 2005) através de transplantes de órgãos (ANTINORI et al., 2008) e pelo compartilhamento de agulhas/seringas contaminadas. Esta última vem sendo a principal forma de transmissão de LV em países do Mediterrâneo (ALVAR et al., 2008; CRUZ et al., 2006). Recentemente tem-se especulado a hipótese de que algumas pulgas (COLOMBO et al., 2011) e carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2011) serviriam como vetores de *Leishmania* para cães, porém ainda são necessários alguns estudos para entender melhor a participação destes na epidemiologia da doença (COLOMBO et al., 2011; DANTAS-TORRES, 2011).

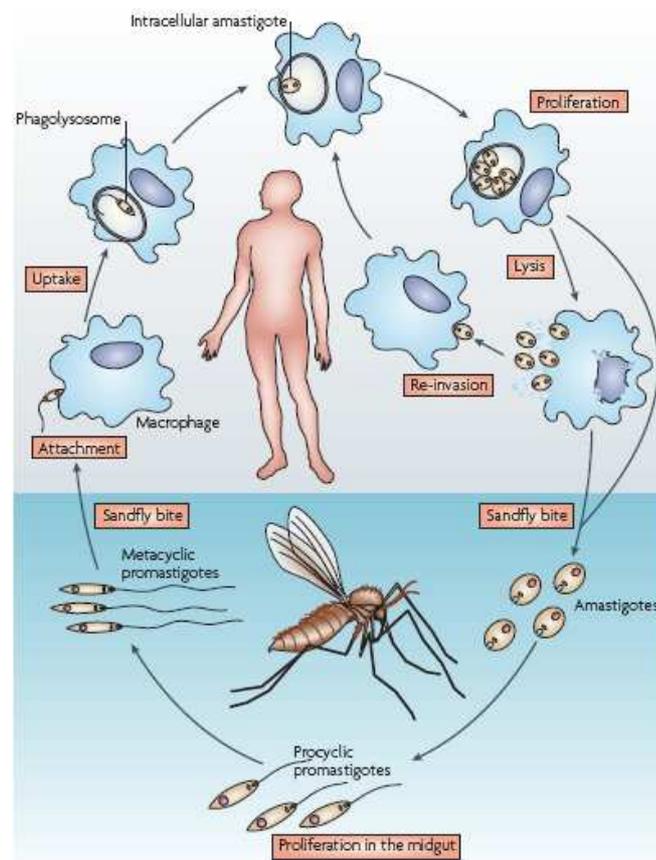
A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros vertebrados é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília

Phlebotominae, mais conhecidos por flebotomíneos (REY, 2001), sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie transmissora no Brasil (Figura 3) (BRASIL, 2009).



**Figura 3** – Fêmea de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV.  
Fonte: Brasil (2006).

A infecção do vetor ocorre quando este, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No interior do inseto, estas se diferenciam em formas promastigotas, e se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária (BRASIL, 2006). Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, o inseto vetor libera as formas promastigotas, que serão fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro. No interior dos macrófagos ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas, que irão se multiplicar intensamente até o rompimento dos macrófagos, levando à liberação das amastigotas que poderão se disseminar para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea ou ser ingeridas por novos insetos vetores (Figura 4) (MICHALICK; GENARO, 2005).



**Figura 4** – Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.

Fonte: Chappuis et al. (2007).

Nota: A forma promastigota do parasito é transmitida por uma fêmea de flebotomo. Após a transmissão, os parasitas são internalizados pelos macrófagos e perdem seu flagelo, mudando para a forma amastigota. As amastigotas se multiplicam, destroem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas, se disseminando nos sistemas linfático e vascular ou re-infectando o inseto vetor.

## 1.2 Co-endemicidade

A maioria das infecções por LV ocorre em áreas remotas ou de difícil acesso – nas quais as unidades de saúde existentes são inadequadas ou escassas – e onde existem co-infecções com outras parasitoses debilitantes. Sob estas circunstâncias, essa endemia geralmente apresenta um dilema quanto ao seu diagnóstico (HAILU et al., 2005) que, em muitas situações, só pode ser concluído por meio de provas laboratoriais, já que as áreas endêmicas de diversas doenças se sobrepõem em grandes faixas do território brasileiro (BRASIL, 2009).

Hassan et al. (2006) relatam que há um potencial de sobreposição das distribuições do parasita protozoário *Leishmania (L.) donovani* e o helminto *Schistosoma mansoni* em muitos

países; e que a probabilidade de ocorrer uma co-infecção entre estes dois parasitos no homem é aumentada pela sua cronicidade, a propagação da esquistossomose através da irrigação, e o deslocamento de pessoas entre as áreas endêmicas.

Segundo dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2007 e 2009 o Brasil notificou casos de LV, esquistossomose, tuberculose e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em diversos estados da Federação. É importante atentar que, em regiões onde mais de uma endemia predomina, se faz necessário o uso de técnicas específicas para diagnosticá-las de forma mais precisa.

Há relato de dispersão de *L. (L.) chagasi* em áreas endêmicas para *L. (V.) braziliensis* e para *Trypanosoma cruzi* no Brasil (GOMES et al., 2007). Brito e outros (2009), mostraram que existe uma diversidade de espécies de *Leishmania (Viannia)* em uma área endêmica para a leishmaniose tegumentar americana demonstrando, inclusive, a co-existência de duas ou mais espécies numa mesma área. Pereira-Chioccola, em 2009, relata que a diversidade endêmica encontrada nas regiões brasileiras é um fator que corrobora para interferir na especificidade dos métodos laboratoriais convencionais.

### 1.3 Diagnóstico laboratorial

#### 1.3.1 Diagnóstico parasitológico

A busca microscópica da *Leishmania* permanece como o padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose visceral devido à sua alta especificidade (SRIVASTAVA et al., 2011). Esta técnica demonstra as formas amastigotas do parasito, geralmente observados dentro de células fagocíticas (FAUCHER; PIARROUX, 2010) em esfregaços realizados a partir de punções de linfonodos, medula óssea e baço. Os esfregaços do baço possuem a melhor sensibilidade, variando entre 93,1 a 98,7%, já os de medula óssea e linfonodo têm menor sensibilidade com 52-85% e 52-58%, respectivamente (SRIVASTAVA et al., 2011).

Contudo, essas punções são consideradas invasivas, possuindo contra-indicações, e exigem ambientes e profissionais habilitados para a coleta. Desta forma, esses procedimentos não são adequados para estudos epidemiológicos e, algumas vezes, também para diagnósticos individuais (SUNDAR; RAI, 2002; SILVA; STEWART; COSTA, 2005).

A cultura sofre as mesmas dificuldades da microscopia, por utilizar uma amostra obtida através de um procedimento invasivo, apresentar variações na sensibilidade e necessitar de um profissional experiente, além de ser uma técnica demorada e de alto custo. Isso torna a técnica pouco requisitada para o diagnóstico clínico, sendo utilizada apenas em laboratórios de pesquisa (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Diagnóstico sorológico

Uma ampla gama de métodos sorológicos, variando em sensibilidade e especificidade, estão disponíveis para o diagnóstico da LV. Dentre eles estão o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), o Ensaio imunoenzimático (ELISA), o Teste de Aglutinação Direta (DAT) e o teste Imunocromatográfico Rápido rK39 (rK39-ICT) (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

A IFI se baseia na detecção de anticorpos, que podem ser demonstrados em estágios iniciais da infecção e são indetectáveis do sexto ao nono mês após a cura. É um método sensível (96%) e específico (98%), mas sua necessidade de condições laboratoriais apropriadas não permite o seu uso no campo (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Esse método possui limitações em termo de especificidade e reprodutibilidade, podendo apresentar reações cruzadas com agentes causadores de outras doenças como, por exemplo, LTA, doença de chagas, esquistossomose e tuberculose (GONTIJO; MELO, 2004). No Brasil, esta é a técnica disponibilizada e mais utilizada pelos laboratórios de referência no Sistema Únicos de Saúde (BRASIL, 2006).

O ELISA é outra técnica de detecção de anticorpos para o diagnóstico da LV. Sua sensibilidade e especificidade dependem do tipo de antígeno utilizado (bruto ou purificado). Apesar do grande número de antígenos já estudados, ainda não existe um antígeno padrão para esta técnica. Devido à necessidade de técnicos treinados e equipamentos, esta técnica não é aplicada para o diagnóstico de rotina em regiões endêmicas para a LV em humanos (SRIVASTAVA *et al.*, 2011), sendo utilizada na rotina apenas para o diagnóstico da LV canina (BRASIL, 2006).

O DAT é uma técnica simples, sensível e altamente específica (SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Em um estudo de meta-análise utilizando o DAT, sua sensibilidade e especificidade foram estimadas em 94,8% e 85,9%, respectivamente. Contudo, suas maiores

desvantagens são a necessidade de múltipla pipetagem, tempo de incubação relativamente longo e o alto custo do antígeno (CHAPPUIS *et al.*, 2006).

Na América Latina o teste rápido rK39-ICT é amplamente utilizado para o diagnóstico em humanos, e possui diversas vantagens sobre a IFI ou em testes baseados no ELISA (DESJEUX, 2004). O rK39-ICT tornou-se popular recentemente e tem sido considerada uma técnica altamente sensível, além de um indicador confiável de calazar (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Em um estudo de meta-análise, sua sensibilidade foi de 98,4-100% e a especificidade foi de 81,2-96,4% (BOELAERT *et al.*, 2008).

O rK39-ICT e o DAT possuem algumas desvantagens em comum, dentre elas a incapacidade de diferenciar entre uma infecção ativa e assintomática e a permanência de um resultado positivo após a cura (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Diagnóstico molecular baseado em PCR

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica eficaz até quando realizada a partir de uma única molécula de DNA (MELO, 2006), tornando possível detectar baixas cargas parasitárias (FAUCHER; PIARROUX, 2010). Esta técnica baseia-se em ciclos que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo, na presença de reagentes termoestáveis e sequências específicas de DNA a serem amplificadas. Os reagentes são: (1) dois pequenos iniciadores (*primers*), sintetizados para serem complementar às sequências desejadas do DNA alvo e dar início à amplificação enzimática, (2) quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), formando uma solução chamada dNTP, (3) a enzima termoestável *Taq* DNA polimerase, (4) íons magnésio e (5) tampão (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

É realizada em três etapas, repetidas, em média, por 25 a 35 ciclos. Cada etapa possui uma temperatura ótima para sua maior eficiência. As etapas são: (1) Desnaturação do DNA, tipicamente realizada a uma temperatura próxima a 90 °C; (2) Anelamento dos *primers* ao DNA-molde, que ocorre a uma temperatura em geral entre 40 a 70 °C; e (3) extensão dos *primers*, que corresponde a síntese de DNA pela enzima DNA polimerase, usualmente a 72 °C (RODRIGUES; SILVA ;SIQUEIRA, 2006).

O produto final da reação de PCR é chamado de amplicon, que consiste em um fragmento de DNA fita dupla, cujas extremidades são definidas pela extremidade 5' de cada

um dos *primers* e cujo tamanho é dado pela distância entre os mesmos. A visualização mais aplicada do amplicon é através da realização de uma eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio e posterior visualização em transiluminador de luz ultravioleta (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2006).

É importante observar as condições ideais de concentração dos componentes da reação, pois não existe um protocolo padrão que possa ser usado para todas as amplificações. O número de ciclos, a concentração dos íons magnésio, da enzima e do DNA molde, assim como a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers*, devem ser cuidadosamente ajustadas para cada tipo de reação que se proceda (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

Outro fator fundamental no preparo das reações é relacionado à fonte da qual o DNA será extraído. Deve-se considerar a introdução ou a presença de inibidores da DNA polimerase durante o processo de extração do DNA. Entre os inibidores estão substâncias como o grupo heme da hemoglobina, assim como os que geralmente são introduzidos no processo de coleta ou extração do material biológico como o fenol e o clorofórmio (que podem inibir a ação enzimática); a proteinase-K (pode degradar a DNA polimerase); o EDTA e a heparina (quelantes dos íons magnésio) (SAMBROOK et al., 1989).

Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR se torna muito adequada para procedimentos de diagnóstico. Estes fatores estão diretamente ligados ao conjunto de *primers* utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (CORTES et al., 2004; SALAM et al., 2010).

Somente na última década as técnicas moleculares ficaram mais acessíveis e eficientes. Além de sua rapidez, a PCR apresenta a vantagem de requerer quantidades muito pequenas de DNA. Quando disponível, a PCR é uma excelente ferramenta para o diagnóstico e monitoramento da LV (MARY et al., 2006), e tem sido vista como uma técnica alternativa quando o paciente apresenta suspeita clínica, e a microscopia e/ou a sorologia são negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009).

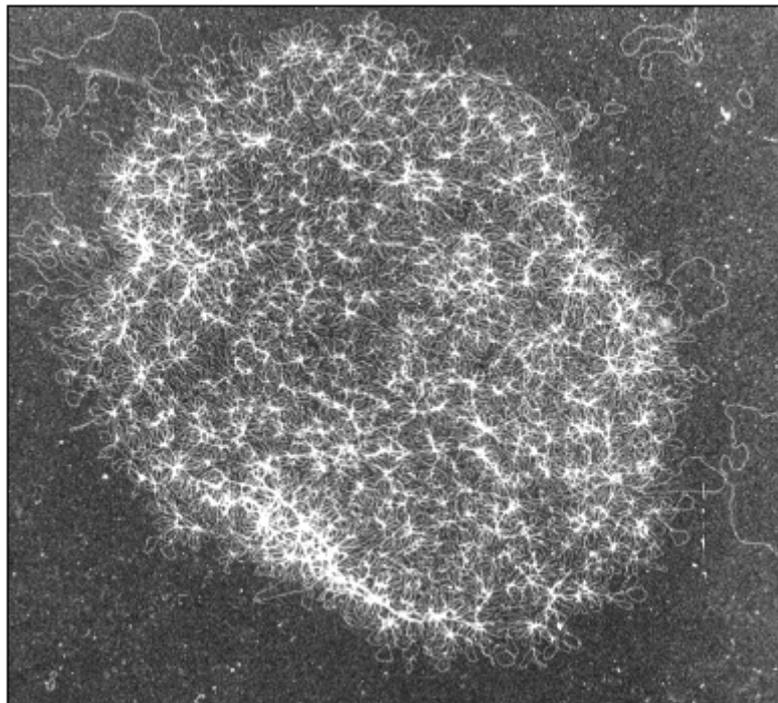
Em 2007, Antinori e colaboradores realizaram um estudo clínico comparativo entre técnicas microbiológicas convencionais e um sistema de PCR espécie-específica (*primers* R223 e R333) para *Leishmania*, utilizando amostras de sangue periférico e de aspirado de medula óssea, e encontraram, para a PCR, sensibilidades de 95,7% para as amostras de aspirado e 98,5% para as amostras de sangue, enquanto que para o isolamento da medula óssea, teste sorológico e microscopia utilizando material da biópsia de medula óssea, as sensibilidades encontradas foram de 76,2%, 85,5% e 90,2%, respectivamente.

### 1.3.3.1 Alvos utilizados em PCR

#### a) DNA do cinetoplasto (kDNA)

Os membros da família Trypanosomatidae possuem propriedades biológicas incomuns, dentre elas a presença de uma única rede compacta de DNA mitocondrial conhecida como DNA do cinetoplasto (kDNA), presente em cada célula do tripanossomatídeo (KLINGBEIL; ENGLUND, 2004).

O cinetoplasto possui arranjos de dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que juntos formam o kDNA, correspondendo entre 15% e 35% do DNA celular total (BREWSTER; BARKER, 2002; LAMBSON; BARKER, 2002; KLINGBEIL; ENGLUND, 2004).



**Figura 5** - Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania sp.* composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos.

Fonte- Barker (1989).

**Nota:** Os maxicírculos podem ser visualizados na periferia da rede do kDNA.

Os maxicírculos possuem cerca de 20 a 40kb de comprimento e estão presentes em 30 a 50 cópias. Já os minicírculos representam 95% do kDNA (RAY, 1987) e estão presentes em cerca de 10.000 cópias, apresentando um tamanho de 0.5 a 10 kb de comprimento dependendo da espécie (DEGRAVE *et al.*, 1994; LUKES *et al.*, 2002; RODGERS *et al.*, 1990).

Alguns estudos descrevem que a função dos maxicírculos é parecida com a das mitocôndrias dos eucariotos convencionais, ou seja, eles codificam alguns produtos genéticos como o RNA ribossômico (RNAr) e subunidades de complexos respiratórios. Contudo, a única função dos minicírculos descoberta até agora é a de que eles servem para codificar RNAs guias (RNAg), que são moldes para a edição dos transcritos dos maxicírculos (KLINGBEIL; ENGLUND, 2004; LUKES *et al.*, 2002). Contudo, já foram propostos um papel estrutural (SIMPSON, 1997) e um de expressão de produtos de proteína (SINGH; RASTOGI, 1999).

#### b) Uso do kDNA

O minicírculo do kDNA é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico de calazar humano. Sua vantagem está no fato do grande número de cópias por célula (SILVA *et al.*, 2010), o que permitiu a criação de ensaios baseados em PCR ultrasensíveis quando comparados com sistemas que utilizam como alvo seqüências menos repetitivas (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

Os alvos escolhidos são importantes pelas suas sensibilidade e especificidade, características do ensaio que são intrínsecas a escolha dos *primers*, que podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos (DENIAU *et al.*, 2003).

O uso de *primers* desenhados a partir do kDNA possibilita também a identificação da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (RODGERS *et al.*, 1990), sendo de extrema importância em regiões nas quais a infecção pode ser causada por mais de uma espécie do parasito (LAMBSON; SMYTH; BARKER, 2000).

### c) Primers RV1 e RV2

Muitos *primers* foram desenvolvidos para pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando como alvo o kDNA, contudo os *primers* desenhados por Ravel e colaboradores (1995), e adaptados por Le Fichoux et al. (1999), são os mais aplicados na amplificação do minicírculo do kDNA (SILVA et al., 2010). A região amplificada é a LT1, a qual apresenta uma sequência de 145 pb, e os sistemas desenvolvidos já foram utilizados por diversos autores (AOUN et al., 2009; AYLLON et al., 2008; COELHO et al., 2010; FAKHAR et al., 2008; FERROGLIO et al., 2006; GARCEZ et al., 2010; GOMES et al., 2007; KAZEMI et al., 2008; KONGKAEW et al., 2007; LACHAUD et al., 2002a, b; LIMA JUNIOR et al., 2009; MOTAZEDIAN et al., 2008; SHOURIJEH et al., 2006; TOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

Os bons resultados para esses *primers* foram obtidos tanto utilizando técnicas convencionais de PCR como a PCR em Tempo Real (GERAMIZADEH; FAKHAR; MOTAZEDIAN, 2006; KONGKAEW et al., 2007; MARY et al., 2004; SUKMEE et al., 2008; VILLINSKIA et al., 2008). Os sistemas apresentaram valores de detecção de 0,001 parasito/mL, identificando DNA de *Leishmania* em portadores assintomáticos, quando as técnicas convencionais de diagnóstico falharam, indicando uma boa correlação entre os níveis de parasitemia e o estado clínico dos pacientes (FAKHAR et al., 2008; MARY et al., 2004).

A PCR parece ser a técnica que mais se aproxima do ideal, pois, com o uso de *primers* apropriados, a sensibilidade e a especificidade da técnica pode se aproximar de 100% (CORTES et al., 2004; MARQUES et al., 2001).

Diante do exposto, o presente trabalho buscou avaliar a especificidade dos *primers* RV1 e RV2 frente ao DNA de organismos co-endêmicos em regiões com *Leishmania (L.) chagasi*.

*Justificativa*

## 2 JUSTIFICATIVA

Métodos laboratoriais confiáveis são de extrema importância para o diagnóstico acurado de doenças, e, por consequência, são necessários para um correto tratamento, já que algumas drogas, como as leishmanicidas, apresentam alta toxicidade e, quando estas não são utilizadas, levam a um aumento da letalidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

A maior parte das infecções por LV ocorre em áreas nas quais a mesma co-existe com outras parasitoses, como esquistossomose, tuberculose, doença de chagas e LTA (GONTIJO; MELO, 2004). Estas endemias apresentam manifestações clínicas semelhantes à LV, fator que corrobora para interferir na especificidade dos métodos laboratoriais tradicionalmente empregados (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Dentre os vários métodos diagnósticos para a LV, não existe nenhum que apresente 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). Estes problemas diagnósticos, associados com a ocorrência das doenças endêmicas em áreas pobres, têm incitado o desenvolvimento e a avaliação de testes práticos e baratos, que apresentem alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da endemia.

A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada em diversas amostras clínicas ao mesmo tempo, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais, tornando-a uma técnica promissora para o diagnóstico da LV. Os alvos escolhidos para a PCR são importantes devido à suas sensibilidade e especificidade, características do ensaio que são intrínsecas a escolha dos *primers*, e que podem resultar falsos positivos ou falsos negativos (DENIAU *et al.*, 2003). Entretanto, se fazem necessários estudos de especificidade frente a agentes etiológicos para esta técnica, principalmente em áreas onde diversas endemias co-existem.

Já foram publicados diversos estudos (ANDRESEN *et al.*, 1997; ATTAR *et al.*, 2001; BARKER *et al.*, 1991; DOURADO *et al.*, 2007; FAKHAR *et al.*, 2008; FISA *et al.*, 2008; FISSORE *et al.*, 2004; KAZEMI *et al.*, 2008; KONGKAEW *et al.*, 2007; LIMA JUNIOR *et al.*, 2009; MARY *et al.*, 2004, 2006; MOADDEB; BEHZAD-BEHBAHANI, 2008; MOTAZEDIAN *et al.*, 2008; ONUMA *et al.*, 2001) utilizando iniciadores desenhados a partir do kDNA, dentre eles os iniciadores avaliados neste trabalho, o RV1 e RV2, desenhados por Ravel e colaboradores (1995), e adaptados por Le Fichoux *et al.* (1999), tendo como alvo a

região conservada dos minicírculos do kDNA de *L. (L.) chagasi* e que têm apresentado ótimos resultados quanto à sua sensibilidade, sendo bastante utilizado para o diagnóstico da LV.

Ravel e colaboradores, em 1995, testaram a especificidade dos *primers* frente ao DNA de outros organismos. Entretanto o mesmo não foi realizado por Le Fichoux e colaboradores, em 1999, e nem por Dantas-Torres, em 2006. Por conta disso, este trabalho tem como propósito estudar a especificidade dos iniciadores RV1 e RV2 utilizando, para esta finalidade, o DNA de diferentes organismos que possuem áreas endêmicas que se sobrepõem com às da LV, colaborando com a produção científica de dados relacionados à especificidade desses iniciadores, assim como com o diagnóstico molecular desta endemia.

*Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a especificidade dos *primers* RV1 e RV2 frente ao DNA de organismos co-endêmicos em regiões com *Leishmania (L.) chagasi*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar, por meio de análise de alinhamento múltiplo, quais os possíveis agentes etiológicos co-existentes com *Leishmania (L.) chagasi*, detectados pelos *primers* RV1/RV2;
- b) Avaliar a especificidade dos sistemas de RV1/RV2 frente aos seguintes organismos: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Wuchereria bancrofti*, *Ascaris lumbricoides*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* e *Homo sapiens sapiens*;
- c) Avaliar o limiar de detecção dos sistemas utilizando DNA purificado de *L. (L.) chagasi*.

*Materiais e Métodos*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Procedência das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas nos diversos laboratórios dos Departamentos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ (Quadro 1).

Organismo	Meio de obtenção	Laboratório de Procedência	Departamento
<i>Leishmania (L.) chagasi</i> (cepa não caracterizada)	Meio de cultura Schneider	Laboratório de Microbiologia	Departamento de Microbiologia
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Cepa MHOM/BR/75/M2904)	Meio de cultura RPMI	Laboratório de Leishmanioses	Departamento de Parasitologia
<i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y)	Meio de cultura LIT	Laboratório de Imunoparasitologia	Departamento de Imunologia
<i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH)	Verme adulto retirado de camundongo	Laboratório do Serviço de Referência em Esquistosomose	Departamento de Parasitologia
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Verme adulto retirado de paciente	Laboratório do Serviço de Referência Nacional em Filariose	Departamento de Parasitologia
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Verme adulto retirado de paciente	Laboratório do Serviço de Referência Nacional em Filariose	Departamento de Parasitologia
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cepa de referência H37Rv)	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium massiliense</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Mycobacterium bovis</i>	Meio de cultura Löwenstein-Jensen	Laboratório de Imunoepidemiologia	Departamento de Imunologia
<i>Homo sapiens sapiens</i>	Sangue periférico	Laboratório de Doenças Transmissíveis	Departamento de Parasitologia

**Quadro 1** – Procedência dos organismos para a extração de DNA

## 4.2 Extração e purificação do DNA

Foram utilizados os organismos descritos no Quadro 1. A extração e purificação do DNA dos organismos, com exceção das cepas de *Mycobacterium*, foram realizadas com o kit comercial de extração “illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente: em um microtubo contendo o organismo, foram adicionados 100µl da solução de lise tipo 1 e 10µl de proteinase K. Em seguida esse conteúdo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria à 60°C, por 1h. Após esse período, o material foi submetido a uma centrifugação rápida (spin). Foram adicionados 5µl de RNase A, e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 500µl de solução de lise tipo 2, e esperou mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se o material por 10 segundos a 11.000 rpm. Após esta etapa, o conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna do kit, montada juntamente com o tubo coletor. Submeteu-se a uma centrifugação por 1 minuto a 11.000 rpm, sendo o líquido desprezado. Adicionaram-se 500µl de solução de lise tipo 2, e novamente este foi submetido à centrifugação nas mesmas condições, sendo o sobrenadante novamente descartado. Após isso, foram adicionados 500µl de solução de lavagem, centrifugando por 3 minutos a 11.000 rpm. O tubo coletor foi descartado, e a coluna foi transferida para um microtubo. Adicionou-se na coluna 200µl de solução de eluição pré-aquecido à 70°C, e incubou-se por 1 minuto em temperatura ambiente, e submeteu-se à centrifugação por 1 minuto a 11.000 rpm, e a coluna foi descartada, ficando com o microtubo contendo o DNA. Este tubo foi armazenado à -20°C até o momento da sua quantificação.

A extração e purificação do DNA das cepas de *Mycobacterium* estudadas foram realizadas utilizando o método de Fenol-Clorofórmio segundo Sambrook et al. (1989) com algumas modificações: adicionou-se à amostra 200µl de solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%; Proteinase K 20mg/ml) e incubou-se a 60 °C durante 1h; em seguida a amostra foi extraída uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A cada etapa de extração o homogenato era centrifugado a 11.000 rpm por 2 min. Após, desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em álcool isopropílico absoluto gelado e centrifugado a 11000 rpm por 2 min. O “pellet” foi lavado uma vez com etanol a 70%, centrifugado e seco ao ar, durante 30 min. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de TE, incubado durante 1h a 42 °C, e armazenado a -20 °C, para posterior quantificação.

Todo o trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Transmissíveis do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ.

#### 4.3 Análise e quantificação do DNA total

As amostras de DNA extraídas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM), e corados com brometo de etídio e/ou blue green, com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra. A quantificação do DNA foi realizada através de espectrofotômetro, utilizando o aparelho Ultrospec 3000 UV/Visible spectrophotometer, Pharmacia Biotech.

#### 4.4 Avaliação da sensibilidade dos primers

Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) dos *primers* foi construída uma curva de diluição a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *L. (L.) chagasi*, com a finalidade de avaliar a quantidade mínima de DNA que os sistemas estudados seriam capazes de amplificar. Foram efetuadas diluições seriadas de fator 10 resultando nas seguintes concentrações: 0,5 ng/ $\mu$ l, 50 pg/ $\mu$ l, 5 pg/ $\mu$ l, 0,5 pg/ $\mu$ l, 50 fg/ $\mu$ l, 5 fg/ $\mu$ l, 0,5 fg/ $\mu$ l, 0,05 fg/ $\mu$ l. Dois  $\mu$ l de cada diluição foram adicionados nas reações.

Os *primers* utilizados foram o RV1 (senso; 5'- CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e o RV2 (anti-senso; 5'- CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), cujo alvo é uma região conservada do kDNA de *L. (L.) chagasi*, e que produzem um fragmento de aproximadamente 145 pares de base (LACHAUD et al., 2002a; LE FICHOUX et al., 1999; RAVEL et al., 1995). O estudo deste sistema pelos autores supracitados motivou a utilização desse sistema por Dantas-Torres (2006b).

Foram testadas duas PCRs convencionais utilizando os primers descritos acima, diferindo apenas em relação ao volume final da reação. O sistema 1, já padronizado por Dantas-Torres, em 2006, utilizou um volume final de 25 $\mu$ l e o Sistema 2, teste desse estudo, teve como base o volume utilizado por Ravel et al., 1995 e Le Fichoux et al., 1999, sendo o volume final de 50  $\mu$ l.

Os mix utilizados nos sistemas estão listados no Quadro 2. Como controle negativo da reação de PCR, em todas as reações utilizaram-se os reagentes sem a adição de DNA.

Sistema de PCR 1 (25 µl)	Sistema de PCR 2 (50 µl)
2,5 µl de Tampão	5 µl de Tampão
1,5 µl de MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3 µl de MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2,5 µl de dNTP (2mM)	5 µl de dNTP (2mM)
1 µl de RV1 (25 pmoles/µl)	2 µl de RV1 (25 pmoles/µl)
1 µl de RV2 (25 pmoles/µl)	2 µl de RV2 (25 pmoles/µl)
0,5 µl de Taq DNA Polimerase (2,5 U)	0,5 µl de Taq DNA Polimerase (2,5 U)
14 µl de água milli-q autoclavada	30,5 µl de água milli-q autoclavada
2 µl de DNA	2 µl de DNA

**Quadro 2** – Mix dos reagentes utilizados nos Sistemas de PCR

A PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por Le Fichoux e colaboradores (1999), com as seguintes modificações: desnaturação inicial 94° C por 5 min, seguida por 35 ciclos: 94° C por 30s; 67° C por 1 min; 72° C por 30s e uma extensão final a 72° C por 5 min.

#### 4.5 Avaliação da especificidade dos primers

A especificidade dos *primers* foi comprovada de forma teórica e experimental.

Inicialmente, a especificidade teórica dos *primers* foi obtida através da análise de homologia utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”), desenvolvida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (National Institute of Health), Maryland, EUA, a qual analisa a especificidade dos primers em relação ao alvo desejado fazendo alinhamentos com seqüências depositadas em um banco próprio do NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). Esta análise foi realizada para saber se os *primers* RV1 e RV2 anelavam com algum dos organismos avaliados no presente estudo

Após o Blast dos *primers*, a especificidade experimental foi confirmada em laboratório através de amplificações utilizando 1 ng de DNA genômico purificado das espécies listadas na Tabela 1.

Estes experimentos foram realizados em triplicata para confirmar os resultados obtidos.

#### 4.6 Análise dos produtos de PCR

A análise e o registro dos materiais resultantes da PCR foram realizados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM), corados pelo corante Blue Green e/ou brometo de etídeo. Os amplicons foram separados por eletroforese, visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta, e fotografados com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System™ (Sigma St. Louis, MA, USA).

#### 4.7 Considerações éticas

Segundo o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, este trabalho não possui implicações éticas.

## *Resultados e Discussão*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação da sensibilidade dos primers

O limite de detecção do sistema de PCR 1, com 25  $\mu$ l, alcançou a sensibilidade de 1 pg, como demonstrado na figura 6.

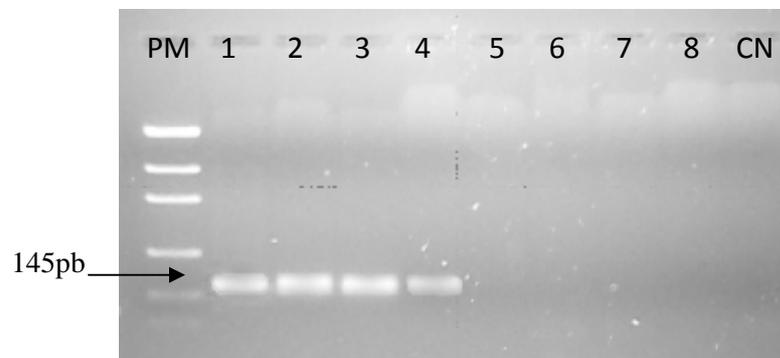


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR simples (protocolo de 25 $\mu$ l) utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de *L. (L.) chagasi* com os primers RV1 e RV2.  
Nota: PM - Peso Molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen); Faixa 1 - 1 ng; Faixa 2 - 100 pg; Faixa 3 - 10 pg; Faixa 4 - 1 pg; Faixa 5 - 100fg; Faixa 6 - 10 fg; Faixa 7 - 1 fg; Faixa 8 - 0,1 fg; CN - Controle Negativo.

Quando o sistema de PCR 2, que utiliza 50  $\mu$ l, foi testado para a mesma curva de diluição, foi possível observar um aumento significativo na sensibilidade da técnica, que conseguiu amplificar 0,1 fg (Figura 7).

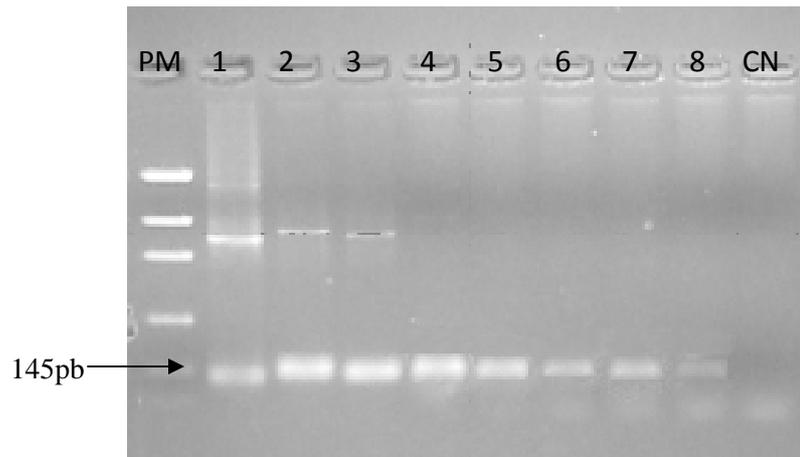


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR simples (protocolo de 50 $\mu$ l) utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de *L. (L.) chagasi* com os primers RV1 e RV2.

Nota: PM - Peso Molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen); Faixa 1 - 1 ng; Faixa 2 - 100 pg; Faixa 3 - 10 pg; Faixa 4 - 1 pg; Faixa 5 - 100fg; Faixa 6 - 10 fg; Faixa 7 - 1 fg; Faixa 8 - 0,1 fg; CN - Controle Negativo.

Comparando os resultados obtidos pelos Sistemas de PCR 1 e 2, podemos observar que o primeiro obteve uma menor sensibilidade quando comparado com o segundo. Segundo Vitale et al. (2004), um parasito tem aproximadamente 100 fg de DNA genômico, o que equivale a um parasito por tubo de PCR. Transformando as concentrações obtidas nos sistemas observamos que o Sistema 1 alcançou o equivalente a 10 parasitos por tubo de PCR, enquanto que o Sistema 2 obteve, em sensibilidade, 0,001 parasito por tubo, ou seja, bem menos de 1 parasito por tubo, o que é considerado um ótimo resultado quando comparado com o primeiro sistema.

Apesar de utilizar um volume final diferente, o resultado obtido pelo Sistema 1 (25 $\mu$ l) foi o mesmo alcançado por Ravel et al. (1995), já que foi a partir desse trabalho que Le Fichoux et al. (1999), adaptaram os primers em estudo (ambos utilizaram 50 $\mu$ l). O resultado obtido pelo Sistema 2 foi semelhante ao obtido por outros trabalhos (GAO et al., 2006; LACHAUD et al., 2002a; b). Gao et al. (2006), obtiveram uma sensibilidade de 0,01 parasito por tubo de reação. Já Lachaud et al. (2002), obtiveram uma sensibilidade de 0,0001 parasito por tubo de reação, ao estudarem a sensibilidade dos *primers* a partir de amostras de sangue periférico de cães sadios (com quantidades conhecidas de parasitos) e parasitos purificados a partir de culturas.

Uma possível explicação para esta diferença de resultados observados entre este trabalho, e os trabalhos de Gao et al. (2006), e Lachaud et al. (2002), pode ser devido à diferença na quantidade de *Taq* DNA polimerase, a concentração de íons magnésio e a temperatura de anelamento utilizados.

Esta maior sensibilidade alcançada pelo Sistema 2 pode ser atribuído à presença de uma menor quantidade de inibidores de PCR neste sistema, já que este possui um volume final maior, levando a uma diluição dos possíveis inibidores presentes, já que em ambos são adicionadas a mesma quantidade de DNA (dois microlitros).

Segundo Spanakos et al. (2002), o isolamento do DNA é um processo crítico para o sucesso da reação de PCR, especialmente em amostras que contenham inibidores, devendo o método de extração visar à eliminação destes. Rodrigues, Silva e Siqueira (2006) relatam que a diluição do DNA pode resolver o problema dos inibidores de PCR presentes na própria amostra biológica (como o grupamento heme, bilirrubina e sais) ou nos reagentes utilizados na coleta e extração (EDTA, proteinase K, fenol/clorofórmio).

Lachaud et al. (2002a) relatam ainda que dentre os seis pares de primers avaliados em seu trabalho, os primers RV1 e RV2 possuem resultados de fácil interpretação, apresentam raros artefatos na corrida do gel de agarose e os consideram como primers extremamente sensíveis capazes de detectar pessoas assintomáticas. Contudo, Silva et al. (2010), relatam que sistemas que produzem amplicons com baixo número de pb (145pb), como os que utilizam o RV1 e RV2, podem levar a erros na interpretação dos resultados, devido ao tamanho próximo ao dos dímeros de *primers*.

Segundo Fakhari et al. (2008), devido à grande quantidade de cópias apresentadas pelo minicírculo do cinetoplasto, é de se esperar que uma PCR utilizando os *primers* RV1/RV2 seja mais sensível até mesmo do que uma Nested-PCR utilizando microsátélites de cópia única, porque os múltiplos minicírculos podem estar presentes na amostra utilizada para a PCR mesmo após diversas diluições.

Ao comparar os *primers* avaliados neste estudo com os utilizados nos seus trabalhos, Kazemi et al. (2008), e Cavalcanti (2008), relataram que os mesmos possuíam baixa sensibilidade.

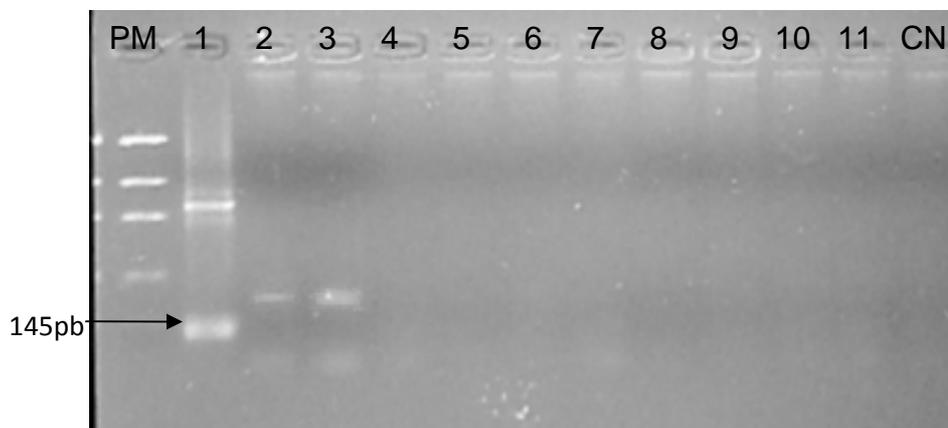
## 5.2. Avaliação teórica e experimental da especificidade dos primers

A especificidade teórica dos *primers*, avaliada pelo Primer-BLAST, demonstrou que estes amplificam o DNA dos parasitos *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* (= *Leishmania (L.) chagasi*), como mostrado no anexo A. Estes dados corroboram os estudos realizados por Lachaud et al. (2002a; b), que relatam

especificidade dos para *L. (L.) donovani* sensu lato, assim como o de outros autores que, ao testarem os primers frente ao DNA de *L. (L.) donovani* (RAVEL et al., 1995) e *L. (L.) major* (AZIZI et al., 2008; RAVEL et al., 1995) obtiveram *amplicons*, sendo o tamanho da banda obtida por Azizi e outros (2008) idêntica à obtida pelos *primers* (145pb) quando utilizados frente ao DNA de *L. (L.) chagasi*.

Ao testar a especificidade experimental dos *primers* frente ao DNA genômico de diversos organismos, foi possível observar que estes não são específicos para espécies do gênero *Leishmania*.

A análise dos produtos de PCR apresentou inespecificidade quando testados com DNA de *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* (Figura 8), resultando em *amplicons* de aproximadamente 145 pb, o mesmo tamanho obtido ao utilizar o DNA de *L. (L.) chagasi*. Entretanto nenhum produto foi observado quando os sistemas foram testados frente ao DNA de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Wuchereria bancrofti*, *Ascaris lumbricoides*, *Homo sapiens sapiens* e das cepas de *Mycobacterium sp.* (Figuras 8 e 9).



**Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade da PCR.

Nota: Foi utilizado 1 ng de DNA genômico de: *L. (L.) chagasi* (1); *Trypanosoma cruzi* (2); *Schistosoma mansoni* (3); *Mycobacterium chelonae* (4); *Mycobacterium massiliense* (5); *Mycobacterium intracellulare* (6); *Mycobacterium fortuitum* (7); *Mycobacterium tuberculosis* (8); *Mycobacterium smegmatis* (9) *Mycobacterium bovis* (10); *Wuchereria bancrofti* (11); PM – Peso Molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen); CN – Controle Negativo.

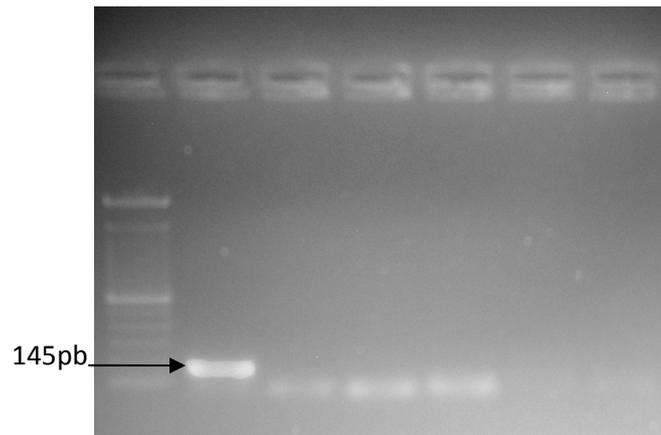


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade da PCR.

Nota: Foi utilizado 1 ng de DNA genômico de: *L. (L.) chagasi* (1); *L. (V.) braziliensis* (2); *Ascaris lumbricoides* (3); *Homo sapiens* (4); PM – Peso Molecular (100 bp DNA Mass Ladder – Invitrogen); CN – Controle Negativo.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos relatados por outros autores (COLOMBO *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2007; LACHAUD *et al.*, 2002a; b; MOTAZEDIAN *et al.*, 2008; PEREIRA, 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009; RAVEL *et al.*, 1995), pois todos eles encontraram 100% de especificidade para os *primers* RV1 e RV2.

Em relação à amplificação obtida ao utilizar o DNA de *T. cruzi*, nosso trabalho discorda dos trabalhos de outros autores que também testaram a especificidade para este parasito e não observaram nenhuma amplificação (GOMES *et al.*, 2007; RAVEL *et al.*, 1995; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009), enquanto que, no presente estudo, foi possível observar amplificação frente ao DNA de *T. cruzi*. Este resultado, juntamente com o obtido para o DNA de *S. mansoni*, pode ter sido acarretado pela diluição dos possíveis inibidores de PCR, ao utilizar o protocolo de 50µl.

Alguns autores (GOMES *et al.*, 2007; PEREIRA, 2005; PEREIRA-CHICCOLA, 2009) testaram a especificidade dos *primers* frente às três espécies de *Leishmania* mais prevalentes no Brasil: *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, e só encontraram resultado positivo para o DNA de *L. (L.) chagasi*, o que corrobora com o nosso estudo, que também encontrou resultado negativo ao utilizar DNA de *L. (V.) braziliensis*.

Alguns trabalhos testaram os *primers* RV1 e RV2 para outros organismos não estudados neste trabalho, e não encontraram nenhuma amplificação. Gao *et al.* (2006) testaram DNA obtido a partir de sangue de pacientes com malária maligna (causada pelo *Plasmodium falciparum*) e malária terçã (causada pelo *Plasmodium vivax*). Motazedian *et al.* (2008) testaram a PCR utilizando sangue de indivíduos com leishmaniose cutânea, malária,

brucelose e cisto hidático. A especificidade foi ainda confirmada por testes de DNA extraído de outras bactérias causadoras de doenças caninas como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia canis* e *Ehrlichia canis* (COLOMBO et al., 2011; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009) que não apresentaram nenhuma amplificação.

Pereira-Chioccola (2009) testou o DNA de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia canis* e *Ehrlichia canis* na concentração de 85-90ng, ocorrendo amplificação para o DNA de *L. chagasi*, apresentando 145pb. Este resultado alcançado pode ter sido causado pelo uso de grandes concentrações de DNA, o que pode ter inibido as reações de PCR.

Algumas regiões endêmicas para LV podem ser também endêmicas para *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, agentes causadores da leishmaniose tegumentar americana; *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de chagas (GOMES et al., 2007; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009); ou até mesmo para o *Schistosoma mansoni*, o agente etiológico da esquistossomose mansônica. Em áreas onde estes organismos estão presentes, os sinais clínicos e a patologia não irão sempre diferenciá-los podendo, inclusive, se sobrepor (NABITY et al., 2006).

Em relação ao DNA de *S. mansoni* e das espécies de *Mycobacterium* avaliados no presente estudo, não foi encontrado nenhum relato que testou o DNA destes organismos utilizando os primers RV1 e RV2.

A determinação da especificidade teórica e experimental para um sistema baseado em PCR deve ser considerada como um pré-requisito para qualquer estudo que faça uso da PCR, pois a escolha dos *primers* que serão utilizados na PCR é de crucial importância, além de ser um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação.

*Conclusões*

## 6 CONCLUSÕES

- a) O Sistema de PCR 2 (50  $\mu$ L), apesar de utilizar um volume maior, justifica a sua utilização, pois apresentou uma sensibilidade maior ( $10^4$  vezes) em relação ao Sistema de PCR 1, com 25  $\mu$ L.
- b) O tamanho das bandas formadas pelos *primers* RV1 e RV2 é muito pequeno (145pb), o que dificulta a sua visualização e diferenciação dos dímeros de *primers* formados na reação.
- c) Aparentemente, os *primers* estudados apresentaram inespecificidade em relação ao *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, por isso, não se recomenda o uso destes *primers* em áreas onde estas espécies são co-endêmicas com a LV. Devem ser realizados outros estudos para confirmação desses resultados, como uma curva de diluição, o teste dos *primers* em amostras biológicas e sequenciamento.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ALAM, M. Z. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. Tropical Medicine International Health, Oxford, v. 14, p. 499–503, 2009.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 21, p.334–359, 2008.
- ANDRESEN, K. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. Tropical Medicine International Health, Oxford, v. 2, p. 440-444, 1997.
- ANTINORI, S. et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 44, p. 1602–1610, 2007.
- ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 8, p. 191–199, 2008.
- AOUN, O. et al. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.166, p. 27–31, 2009.
- ATTAR, Z. J. et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Tropica, Basel, v. 78, p. 11-16, 2001.
- AYLLON, T. et al. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v. 1149, p. 361–364, 2008.
- AZIZI, K. et al. First Detection of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus (Larrousius) major* (Diptera: Psychodidae) from Iran. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 8, p. 726-731, July, 2008.
- BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. Parasitology, Cambridge, v. 99, p. 125–146, 1989.

BARKER, D. et al. Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sandflies and culture. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, p. 73-74, 1991.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 46, p. 1897–1900, June, 2008.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 102, p. 32–40, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF, 2006. 120p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral. In: \_\_\_\_\_. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília, DF, 2009. p. 31-64.

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.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

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

CHAPPUIS, F. et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. British Medical Journal, London, v. 333, p. 1-5, 2006.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, p. 7-16, Nov. 2007.

COELHO, W. M. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária, São Paulo, v.19, p. 256-258, Oct./Dec. 2010.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitology Research, Berlin, p. 1-8, Jan. 2011.

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

CRUZ, I. et al. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. Lancet, London, v. 359, p. 1124–1125, 2002.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006a.

DANTAS-TORRES, F. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de paulista, estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006b.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. Trends in Parasitology, Oxford, v. 27, p. 155-159, 2011.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 89, p.463-469, 1994.

DENIAU, M. et al. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v.97, p.15-33, 2003.

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

DOURADO, Z. F. et al. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). Revista de Patologia Tropical, Goiânia, v. 36, p. 205-214, 2007.

FAKHAR, M. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v.102, p.1–7, 2008.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. Revue de medecine interne, Paris, v. p. 1-8, 2010.

FERROGLIO, E. et al. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v.100, p.636—641, 2006.

FISA, R. et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 78, p. 741-744, 2008.

FISSORE, C. et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42. p. 5332-5333, 2004.

GAO, C. H. et al. Study on PCR Method for Detecting the Asymptomatic Infection of *Leishmania infantum*. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, Shanghai, v. 24, p. 92-96, 2006.

GARCEZ, L. M. et al. Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua, v.1, p.107-116, 2010.

GERAMIZADEH, B.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from southern Iran. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 100, p. 637-640, 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, p. 338-349, 2004.

HAILU, A. et al. Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. PLoS Medicine, San Francisco, v. 2, p. 590-594, 2005.

HASSAN, M. F. et al. The *Schistosoma mansoni* Hepatic Egg Granuloma Provides a Favorable Microenvironment for Sustained Growth of *Leishmania donovani*. The American Journal of Pathology, New York, v.169, p. 943-953, 2006.

KAZEMI, B. et al. The ability of T2/B4 primers to detect *Leishmania infantum* among peripheral blood of visceral leishmaniasis patients in Iran. African Journal of Biotechnology, Nairobi, v.7, p. 860-864, 2008.

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.

KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND P. T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, Washington, v. 101, p. 4333-4334, 2004.

KONGKAEW, W. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 38, p. 8-12, 2007.

KUBAR, J. et al. Transmission of *L. infantum* by blood donors. Nature Medicine, New York, v. 3, p. 368, 1997.

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

LACHAUD, 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, 2002b.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *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.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature: Reply. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, p. 108, 2006.

LAMBSON, B.; BARKER, D. C. Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 96, p. 75–80, 2002.

LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. C. *Leishmania donovani*: development and characterization of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. Experimental Parasitology, New York, v. 94, p. 15-22, 2000.

LE FICHOUX, Y. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 37, p. 1953-1957, June 1999.

LIMA JUNIOR, M. S. C. et al. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 42, p. 303-308, 2009.

LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. Eukaryotic Cell, Washington, v.1, p. 495–502, Aug. 2002.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, Washington, v. 104, p. 9735-9380, 2007.

LUZ, C.I.S.; AGUIAR-SANTOS, A. M. Leishmaniose Visceral: perfil clínico-ambulatorial e epidemiológico de crianças internadas em um hospital público, em Recife. Arquivos Brasileiros de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 18, p. 19-28, 2005.

MARQUES, M. J. et al. Simple form clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 65, p. 902-906, 2001.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42, p. 5249–5255, 2004.

MARY, C. et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 75, p. 858–863, 2006.

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

MELO, F. L. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni*. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MICHALICK, M. S.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral. In: NEVES, D.P. et al. Parasitologia Humana, 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67-83.

MOADDEB, A.; BEHZAD-BEHBAHANI, A. A Simple and Rapid DNA Purification Method for Detection of *Leishmania* DNA in Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. Shiraz E-Medical Journal, Shiraz, v. 9, p. 75-81, Apr. 2008.

MOTAZEDIAN, M. et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 60, p. 151-154, 2008.

NABITY, M. B. et al. An atypical case of *Trypanosoma cruzi* infection in a young English Mastiff. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 140, p. 356–361, 2006.

NATIONAL NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (Estados Unidos). Primer-BLAST. Disponível em : <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)>. Acesso em: 5 abr. 2010.

ONUMA, H. et al. A case of mucosal leishmaniasis: beneficial usage of polymerase chain reaction for diagnosis. International Journal of Dermatology, Philadelphia, v. 40, p. 765-767, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/)>. Acesso em: 10 dez. 2010a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis magnitude of the problem. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/print.html)>. Acesso em: 10 dez. 2010b.

PAGLIANO, P. et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London, v. 55, p. 229–233, 2005.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 14, p. 1032-1039, 2010.

PEREIRA, E. F. A. Variabilidade genética e diagnóstico molecular da *Leishmania spp.*, pelas técnicas de RAPD e PCR, no Estado do Paraná e casos importados. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the American visceral leishmaniasis surveillance program in Sao Paulo state. Boletim Epidemiológico Paulista, São Paulo, v. 6, p. 4–13, 2009.

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, p. 177-190, 1987.

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.

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.

RODRIGUES, J. J. S.; SILVA, R. C.; SIQUEIRA, M. M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.

SALAM, M. A. et al. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. Acta tropica, Basel, v. 113, p. 52-55, 2010.

SAMBROOK, J. et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHOURIJEH, S. J. et al. First report of visceral leishmaniasis in a German shepherd dog in Fars Province, Southern Iran. Comparative Clinical Pathology, London, v.15, p.267-269, 2006.

SILVA, M. A. L. et al. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia, v. 7, p. 1-15, 2010.

SILVA, M. B. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 72, p. 811-814, 2005.

SIMPSON, L. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 86, p. 133-141, 1997.

SINGH, N.; RASTOGI, A.K. Kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania donovani* express a protein product. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1444, p. 263 – 268, 1999.

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

SPANAKOS, G. et al. Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. Molecular and Cellular Probes, London, v.16, p. 415-420, 2002.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 105, p. 1-6, 2011.

SUKMEE, T. et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. International Journal for Parasitology, New York, v. 38, p. 617-622, 2008.

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

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 18, p. 46-51, jul./set. 2009.

VILLINSKIA, J. T. et al. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 60, p. 323–327, 2008.

VITALE, S. F. et al. TaqMan-Based Detection of *Leishmania infantum* DNA Using Canine Samples. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v. 1026, p. 139–143. 2004.

*Anexo*

## ANEXO A – Resultado dos *primers* RV1 e RV2 através do Primer-BLAST

[Primer-BLAST Primer designing tool](#)  
[NCBI/ Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID\_01\_400758\_130.14.22.21\_9000 [more...](#)

Input PCR template  
 none  
 Specificity of primers  
 Target templates were found in selected database: All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Other reports  
[Search Summary](#)  
 Search parameters and other details

Search parameter name	Search parameter value
Number of Blast hits analyzed	4543
Entrez query	
Min total mismatches	2
Min 3' end mismatches	2
Defined 3' end region length	5
Mismatch threshold to ignore targets	7
Misprimed product size deviation	5000
Max number of Blast target sequences	50000
Blast E value	30000
Blast word size	7
Max candidate primer pairs	1000
Min PCR product size	64
Max PCR product size	1000
Min Primer size	15
Opt Primer size	20
Max Primer size	25
Min Tm	57
Opt Tm	60
Max Tm	63
Max Tm difference	3
Repeat filter	AUTO
Low complexity filter	Yes

[Detailed primer reports](#)  
**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
<b>Forward primer</b>	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	22	59.23	63.64%
<b>Reverse primer</b>	CCACCTGGCCTATTTACACCA	22	54.31	50.00%

Products on intended target  


---

 Products on allowed transcript variants  


---

 Products on potentially unintended templates  


---

 Products on target templates  


---

**>J04654.1** L.major minicircle DNA  
 product length = 140  
 Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22  
 Template 151 .....T..... 130  
 Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22  
 Template 12 .....C..... 33  
**>Z35276.1** L.chagasi (AJS-PPECO) kinetoplast DNA  
 product length = 139  
 Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22

```

Template      30 .....TT..... 51
Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      168 ...T.C..... 147

```

>[FR726614.1](#) *Leishmania donovani* BPK282A1 complete genome, chromosome 27

```

product length = 139
Features flanking this product:
  2105 bp at 5' side: rRNA-18S ribosomal RNA (83U) RNA

```

```

Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      1023737 .....TT..... 1023716
Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      1023599 ..A.C..G.C..... 1023620

```

>[EU437407.1](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja\_9 kinetoplast minicircle, complete sequence

```

product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      140 .....TC..... 119

```

```

Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      2  ..A.C..G.C..... 23

```

>[EU437408.1](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja\_8 kinetoplast minicircle, complete sequence

```

product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      140 .....TC..... 119

```

```

Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      2  ..A.C..G.C..... 23

```

>[EU437406.1](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja\_7 kinetoplast minicircle, complete sequence

```

product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      140 .....TC..... 119

```

```

Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      2  ..A.C..G.C..... 23

```

>[EU437403.1](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja\_4 kinetoplast minicircle, complete sequence

```

product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      140 .....TC..... 119

```

```

Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      2  ..A.C..A.C..... 23

```

>[FJ416803.1](#) *Leishmania donovani* isolate MHOM/SD/62/1S-C12D maxicircle, partial sequence; kinetoplast

```

product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template      8537 .....TT..... 8558

```

```

Reverse primer 1  CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template      8675 ..A.C..G.C..... 8654

```

>[AF027578.1](#) *Leishmania infantum* minicircle DNA, partial sequence

```

product length = 136
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TT..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 165 ..AC..G.C..... 144

```

>Z35500.1 *L.infantum* (MCANES/87/LLM-32) kinetoplast DNA, 767 bp

```

product length = 139
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 99 .....TC..... 120

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 237 ..AC..G.C..... 216

```

>Z35501.1 *L.infantum* (MCANES/87/LLM-32) kinetoplast DNA, 774 bp

```

product length = 139
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 92 .....TT..... 113

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 230 ..AC..G.C..... 209

```

>Z35275.1 *L.donovani* (AJS-PEKIN) kinetoplast DNA

```

product length = 139
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TC..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 168 ..AC..G.C..... 147

```

>AJ223724.1 *Leishmania infantum*. Minicircle DNA of *L. infantum* isolated from a kala-azar patient (778 bp)

```

product length = 136
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TT..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 165 ..AC..G.C..... 144

```

>Z35274.1 *L.infantum* (AJS-IPTRS) kinetoplast DNA

```

product length = 139
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TC..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 168 ..AC..G.C..... 147

```

>Z35273.1 *L.infantum* (AJS-IPTPS) kinetoplast DNA

```

product length = 139
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TC..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 168 ..AC..G.C..... 147

```

>Z35270.1 *L.infantum* (AJS-IPTOL) kinetoplast DNA

```

product length = 138
Forward primer 1 CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 22
Template 30 .....TT..... 51

Reverse primer 1 CCACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template 167 ..AC..G.C..... 146

```

>[Z35272.1](#) L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA

```
product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGGGTAGG 22
Template       30  .....TC..... 51

Reverse primer 1  CCRACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template       168  .AC..G.C..... 147
```

>[Z35271.1](#) L.infantum (AJS-IPTEC) kinetoplast DNA

```
product length = 139
Forward primer 1  CTTTCTGGTCCCGGGTAGG 22
Template       30  .....TC..... 51

Reverse primer 1  CCRACCTGGCCTATTTACACCA 22
Template       168  .AC..G.C..... 147
```